

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

In vitro Untersuchung einer Kombinationschemotherapie
mit Bortezomib, Dexamethason und Mafosfamid an
multiplen Myelomzelllinien

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Christoph Beck
aus Mainz

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Prof.-Doz. Dr. med. Thomas Wagner
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Uwe Roblick

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2009
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.12.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung	1
2.1	Multiples Myelom	1
2.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
2.1.2	Klinik.....	1
2.1.3	Diagnose	2
2.1.4	Stadieneinteilung und Prognose	2
2.1.5	Remissionsbeurteilung.....	3
2.1.6	Therapie	4
2.2	Bortezomib.....	5
2.2.1	Bortezomib und das multiple Myelom	7
2.2.2	Kombinationstherapie	8
2.3	Dexamethason.....	9
2.4	Mafosfamid	11
2.5	Fragestellung	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material	14
3.1.1	Reagenzien und Puffer	14
3.1.2	Medien und Zusätze.....	14
3.1.3	Labormaterial	15
3.1.4	Geräte	15
3.1.5	Zytostatika.....	16
3.1.5.1	Bortezomib (Velcade®).....	16
3.1.5.2	Dexamethason (Fortecortin®).....	16
3.1.5.3	Mafosfamid.....	17
3.1.6	Zelllinien.....	17
3.1.6.1	L-363	17
3.1.6.2	OPM-2.....	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Zellkultur.....	18
3.2.1.1	Steriles Arbeiten.....	18
3.2.1.2	Kultivierung und Passagieren	18
3.2.1.3	Kryokonservierung	18
3.2.2	Wachstumskurven.....	19
3.2.3	WST-1 Assay	19
3.2.3.1	Prinzip	19

3.2.3.2	Wachstumsstudien	20
3.2.3.3	Versuchsaufbau	20
3.2.4	Durchflusszytometrie.....	21
3.2.4.1	Prinzip	21
3.2.4.2	Annexin V-FITC Apoptose-Assay.....	22
3.2.4.3	Färbung und Messung	23
3.2.5	“Combination Index”.....	24
3.2.6	Biometrie und Statistik	24
4	Ergebnisse	26
4.1	Wachstumskurven der Zelllinien L-363 und OPM-2	26
4.2	Dosisabhängige Zellüberlebensrate	27
4.2.1	Dosisabhängige Zellüberlebensrate für Bortezomib	27
4.2.2	Dosisabhängige Zellüberlebensrate für Dexamethason	28
4.2.2.1	L-363 behandelt mit Dexamethason	28
4.2.2.2	OPM-2 behandelt mit Dexamethason	28
4.2.3	Dosisabhängige Zellüberlebensrate für Mafosfamid.....	29
4.3	Durchflusszytometrische Analyse	30
4.4	Vergleich der Einzel- und Kombinationsbehandlungen	31
4.4.1	Kombinationsbehandlung mit einer Konzentrationsreihe.....	31
4.4.2	Kombinationsbehandlung mit den IC50	33
4.4.2.1	Kombination von Bortezomib mit Mafosfamid	33
4.4.2.2	Kombination von Bortezomib mit Dexamethason	33
4.4.2.3	Zeitlich versetzte Kombinationsbehandlung.....	34
4.4.2.4	Kombinationsbehandlung und Dexamethason-Resistenz.....	35
4.4.3	„Combination Index“	37
5	Diskussion.....	38
5.1	Hintergrund	38
5.2	Kombination mit Bortezomib	39
5.2.1	In vitro Studien	39
5.2.2	Klinische Studien.....	41
5.2.3	Limitierung der in vitro Untersuchung	42
5.3	Ausblick.....	46
6	Zusammenfassung	48
7	Literaturverzeichnis.....	50
8	Abkürzungsverzeichnis.....	64
9	Danksagung	66
10	Lebenslauf.....	67

2 Einleitung

2.1 Multiples Myelom

Das multiple Myelom (Morbus Kahler) ist eine aggressive, hämatologische Neoplasie, die der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome zugeordnet wird. Es handelt sich um die klonale Proliferation eines Plasmazellklons mit Produktion eines monoklonalen Immunglobulins (Shaheen *et al.*, 2008).

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Innerhalb der lymphohämatopoetischen Neoplasien nimmt das multiple Myelom einen Anteil von ungefähr 15% ein, wobei sich die Inzidenz von 4/100.000 pro Jahr innerhalb von 6 Dekaden nicht relevant verändert hat (Kyle *et al.*, 2004; Alexander *et al.*, 2007). Das mediane Erkrankungsalter von 66 Jahren liegt mit einem nur 2%igen Anteil unter 40 Jahren relativ hoch (Kyle *et al.*, 2003). Allein in Schleswig-Holstein erkrankten im Jahr 2005 234 Patienten an einem multiplen Myelom. Eine für den gleichen Zeitraum festgestellte Mortalität von 132 Patienten zeigt, wie gering die Überlebensrate dieser malignen Erkrankung ist (IKE, 2005).

Die Ursache des multiplen Myeloms ist bisher nicht eindeutig geklärt (Alexander *et al.*, 2007). Ätiologisch könnten radioaktive Strahlung und der Kontakt mit Herbiziden sowie Insektiziden eine Rolle spielen (Ichimaru *et al.*, 1982; Riedel und Pottern, 1992).

2.1.2 Klinik

Der klinische Verlauf des multiplen Myeloms erweist sich als ausgesprochen heterogen und ohne spezifische Frühsymptome. Charakteristischerweise bestehen zum Zeitpunkt der Diagnose bei ungefähr 60% der Patienten Knochenschmerzen, die sich meist als Rücken- oder Thoraxschmerzen manifestieren. Ursächlich finden sich ggf. osteolytische Läsionen oder pathologische Frakturen. So zeigen sich bei ungefähr 80% der neu diagnostizierten Patienten radiologische Veränderungen des Skeletts. Viele Patienten leiden zudem an einer häufig mit einer Anämie assoziierten Abgeschlagenheit und rezidivierenden Infektionskrankheiten (Kyle *et al.*, 2003; Kyle und Rajkumar, 2004). Die übermäßige Produktion monoklonaler Immunglobuline führt zu der labordiagnostisch darstellbaren Konstellation des sogenannten M-Gradienten, eines schmalbasigen Extragradienten in der γ - oder β -Fraktion der Serum-Eiweißelektrophorese. Dieser konnte bei 89% der neu diagnostizierten Patienten im Serum oder Urin dargestellt werden. Bei ungefähr 20% der Pati-

enten tritt eine Niereninsuffizienz auf, die insbesondere durch eine häufig auftretende Hyperkalzämie sowie durch die renale Ablagerung von Immunglobulin-Leichtketten zu erklären ist (Kyle, 1999).

2.1.3 Diagnose

Die Diagnose des multiplen Myeloms erfolgt anhand der Diagnosekriterien der Myeloma Working Group 2003. Verlangt wird eine Serumkonzentration monoklonaler Immunglobuline von über 30 g/l und/oder einem mindestens 10%igen Anteil klonaler Plasmazellen in der Knochenmarksbiopsie sowie das Vorhandensein von Endorganschäden (d.h. Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen) (Anonymus, 2003; Kyle und Rajkumar, 2007). Abzugrenzen sind andere proliferative Plasmazellprozesse, wie die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS), das asymptotische Myelom und das solitäre Plasmozytom (Rajkumar und Kyle, 2005).

2.1.4 Stadieneinteilung und Prognose

Die heutzutage noch weit verbreitete Stadieneinteilung nach Durie und Salmon aus dem Jahr 1975 dient einer prognostischen Einschätzung und Therapieplanung. Sie schließt verschiedene klinische Parameter (Osteolysen, Hämoglobinkonzentration, Serumkalziumkonzentration, monoklonale Immunglobulinkonzentration und Serumkreatininkonzentration) ein, nach denen innerhalb von drei Stadien klassifiziert wird (Durie und Salmon, 1975). Kürzlich wurde eine neue Stadieneinteilung vorgeschlagen, die mittels statistischer Verfahren anhand der Daten von über 10.000 vormals unbehandelten Myelompatienten konzipiert wurde. Das International Staging System (ISS) ermöglicht über die alleinige Bestimmung der Serumkonzentration von β 2-Mikroglobulin und Albumin ebenfalls eine dreistufige Stadieneinteilung, die sich nicht nur als einfacher, sondern auch genauer erwiesen hat (Mihou *et al.*, 2006). Für beide Einteilungen beträgt die mediane Überlebensrate unter Therapie in Stadium I ca. 60 Monate, in Stadium II ca. 45 Monate und in Stadium III nur ca. 30 Monate. Für alle Patienten zusammengenommen liegt die mediane Überlebenszeit mit einer großen Streubreite von 6 Monaten bis 10 Jahren zwischen 3 und 4 Jahren (Durie und Salmon, 1975; Greipp *et al.*, 2005).

Eine sofortige Therapieindikation besteht nach den Leitlinien der European Society for Medical Oncology (ESMO) erst ab Stadium II, da das multiple Myelom in Stadium I als inaktiv angesehen wird und es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass durch eine frühzeitige Behandlung die Überlebenszeit verlängert werden könnte (Hjorth *et al.*, 1993; Harausseau und Dreyling, 2008).

2.1.5 Remissionsbeurteilung

Wie ein Patient auf eine Therapie anspricht, kann anhand der Kriterien der European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) eingeteilt werden. Sie diente den im Verlauf der vorliegenden Arbeit zitierten klinischen Studien als Bewertungsgrundlage. Es wird zwischen einer kompletten, partiellen und minimalen Remission unterschieden, wobei deren Summe die Ansprechrate (overall response) beschreibt. Die Einteilung erfolgt - wie Tabelle 1 zu entnehmen ist - anhand verschiedener klinischer Parameter (Blade *et al.*, 1998).

Tabelle 1: Remissionsbeurteilung nach den Kriterien der European Blood and Marrow Transplantation Group

Komplette Remission, alle Kriterien:

- Kein monoklonales Protein in Serum und Urin (Immunfixationselektrophorese)
- <5% Plasmazellen im Knochenmark
- Keine Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen
- Verschwinden von Weichteilplasmozytomen

Partielle Remission, alle Kriterien:

- >50% Reduktion des monoklonalen Proteins im Serum
- >90% Reduktion monoklonaler Leichtketten im 24h-Sammelurin
- Bei Non-Sekretoren >50% Reduktion der Plasmazellen im Knochenmark
- >50% Reduktion von Weichteilplasmozytomen
- Keine Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen

Minimale Remission, alle Kriterien:

- 25-49% Reduktion des monoklonalen Proteins im Serum
 - 50-89% Reduktion monoklonaler Leichtketten im 24h-Sammelurin
 - Bei Non-Sekretoren 25-49% Reduktion der Plasmazellen im Knochenmark
 - >25-49% Reduktion von Weichteilplasmozytomen
 - Keine Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen
-

2.1.6 Therapie

Die Therapie des multiplen Myeloms stellt in der klinischen Praxis eine besondere Herausforderung dar. Vor Einführung der Chemotherapie betrug die mediane Lebenserwartung weniger als ein Jahr (Osgood, 1960). Erst die Introdution des alkylierenden Zytostatikums Melphalan im Jahr 1962 führte zu längeren Überlebenszeiten und effektiveren Therapiestrategien (Bergsagel et al., 1962; Selby et al., 1987). Als Standardtherapie setzte sich schließlich die Kombination von oral verabreichtem Melphalan und Prednisolon (Alexanian-Schema) durch. Sie führt zu einer 5 Jahre Überlebensrate von 19% und einer medianen Überlebenszeit von ungefähr 3 Jahren (Oken et al., 1997). Es folgten Versuche, andere klassische Chemotherapeutika zu etablieren, so zum Beispiel die Kombination von Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason (VAD-Schema) (Samson et al., 1989). Anhand einer großen Metaanalyse konnte jedoch, bezogen auf die Mortalität, kein Unterschied zwischen den neu entwickelten Kombinationsregimen und der Kombination aus Melphalan und Prednisolon nachgewiesen werden. Die mediane Überlebenszeit belief sich bei allen konventionellen Chemotherapien weiterhin auf ungefähr 3 Jahre (Anonymus, 1998). Weitere Anstrengungen, die Überlebenszeit zu verlängern, führten zur Einführung der Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation. Hierunter kann im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie nicht nur die mediane Überlebenszeit um fast ein Jahr angehoben werden, es wird vielmehr auch eine Verbesserung der Ansprechrate und des Ereignis freien Überlebens (event-free survival) erzielt (Attal et al., 1996; Child et al., 2003). Noch größere Therapieerfolge, d.h. höhere Überlebensraten, werden durch die zweimalige Stammzelltransplantation (Tandem) nach erfolgter Hochdosischemotherapie erreicht. So betrug in einer Studie die geschätzte 7 Jahre Überlebensrate für die einmalig transplantierte Gruppe 21% gegenüber 42% in der zweimalig transplantierten Gruppe (Attal et al., 2003). Die Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation stellt derzeit für Patienten unter 65 Jahren die effektivste Therapiemöglichkeit dar.

Obwohl mittels Stammzelltransplantation eine partielle oder komplette Remission erreicht werden kann, ist die Prognose aufgrund einer hohen Rezidivrate äußerst schlecht, so dass nicht von einem kurativen Therapieansatz gesprochen werden kann (Kyle, 2000). Problematisch auf die Therapiegestaltung und deren Erfolge wirkt sich schließlich auch das durchschnittlich hohe Alter der Myelompatienten aus, von denen viele keine aggressive Chemotherapie tolerieren können (Klepin und Hurd, 2006). Für diesen großen Teil der Patienten bleibt die seit den 60er Jahren eingeführte Kombination aus Melphalan und

Prednisolon (Alexanian-Schema) mit ihren geringen Therapieerfolgen immer noch die aktuelle Standardtherapie (Kumar, 2006; Peest und Ganser, 2007).

Die zuvor beschriebenen Schwierigkeiten in der Behandlung des multiplen Myeloms führen notwendig dazu, neue Therapiemöglichkeiten zu erforschen. In jüngster Zeit haben sich einige neuartige Chemotherapeutika gefunden, deren klinische Relevanz derzeit geprüft wird. Hierzu zählen: Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib (Caers et al., 2008b).

Thalidomid, das als Schlafmittel in den 50er Jahren aufgrund von Teratogenität vom Markt genommen wurde, war das erste dieser Medikamente, das seinen Weg in die Therapie des multiplen Myeloms gefunden hat. Es stellt mittlerweile eine effektive Alternative in der Behandlung des multiplen Myeloms dar. Der hierbei zu Grunde liegende Wirkmechanismus könnte mit einer antiangiogenen Wirkung in Zusammenhang stehen (Singhal et al., 1999; Kumar et al., 2003). Lenalidomid ist ein orales Analogon von Thalidomid und seit 2006 zur Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen (Hazarika *et al.*, 2008). Bortezomib, dessen Untersuchung Teil der vorliegenden Arbeit ist, wird im folgenden Kapitel ausführlich besprochen.

Seit Einführung dieser neuen Medikamente in der klinischen Praxis haben sich die Erfolgsaussichten für Patienten mit multipltem Myelom nachweislich verbessert. Kumar et al. konnten zeigen, dass Patienten mit Rezidiv signifikant länger überlebten (30,9 Monate gegenüber 14,8 Monate), wenn sie mit einem dieser drei Medikamente behandelt wurden (Kumar et al., 2008). Die Verwendung von neuen Therapiestrategien in der Behandlung von Patienten mit Rezidiv spiegelt die Idee wider, dass eine unheilbare Krankheit kontrollierbar werden kann (Srikanth et al., 2008).

2.2 Bortezomib

Bortezomib (früher PS-341) wurde 2003 erstmals unter dem Handelsnamen Velcade[®] zugelassen (siehe Abb.1). Es handelt sich um ein Zytostatikum, das seine Wirkung über die Inhibition eines spezifischen Zielmoleküls - das Proteasomen - entfaltet. Bortezomib zählt somit zur Gruppe der „molecularly targeted therapy“ (Jackmann, 2004).

Entscheidend für die zelluläre Hämostase ist neben der Proteinsynthese auch die Degradation von Proteinen, d.h. die Entfernung unnötig gewordener Proteine. Bei den zellulären

Systemen, die an der Proteindegradation beteiligt sind, kann zwischen dem lysosomalen und dem nicht-lysosomalen System unterschieden werden. Das Proteasomen ist ein Enzymkomplex, der an der nicht-lysosomalen Degradation von Proteinen beteiligt ist. Lokalisiert ist das Proteasomen intrazellulär, assoziiert zum Zytoskelett und endoplasmatischen Retikulum (Wojcik und DeMartino, 2003). Die meist vorkommende Form, das 26S Proteasomen, besteht aus einer 20S Kerneinheit und zwei, 19S genannten, regulativen Untereinheiten, die wie zwei „Deckel“ an die röhrenförmige Kerneinheit assoziiert sind (Mani und Gelmann, 2005). Beim Durchtritt durch die Kerneinheit werden falsch gefaltete, funktionsuntüchtige und beschädigte Proteine durch Proteolyse degradiert (siehe Abb.2) (Nandi et al., 2006).

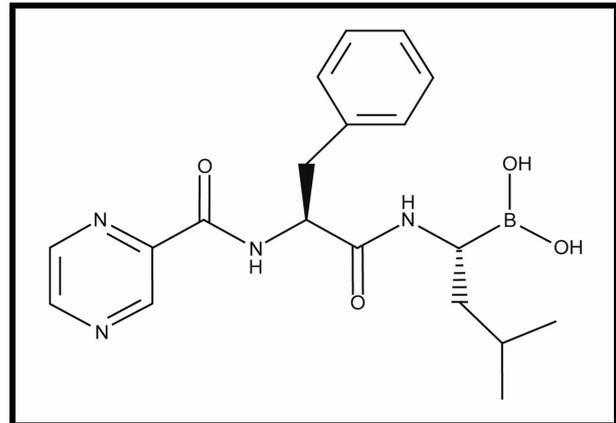


Abb.1: Strukturformel von Bortezomib (Teicher et al., 1999)

Vor der proteasomalen Degradation werden die Proteine markiert. Während dieses mehrstufigen enzymatischen Prozesses wird Ubiquitin, ein kleines, evolutionär hoch konserviertes Protein, kovalent an das Zielprotein gebunden. Durch weitere Bindung von Ubiquitin an bereits gebundenes Ubiquitin entsteht eine Polyubiquitinkette. So markierte Proteine werden vom 26S Proteasomen erkannt und proteolysiert (siehe Abb.2) (Nandi et al., 2006).

Das Proteasomen dient dem enzymatischen Abbau vieler Proteine, die in der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Angiogenese beteiligt sind. Da es hierdurch eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation und Apoptose spielt, ist das Proteasomen zu einem Angriffspunkt in der Tumorthherapie geworden (Montagut et al., 2006). Durch die Inhibition des Proteasomens sammeln sich die zur Proteolyse bestimmten Proteine in der Zelle an, wodurch die Zelle sozusagen an ihrem eigenen „Müll“ erstickt. Beeinflusst werden die intrazellulären Konzentrationen von Regulatoren des Zellzyklus (z.B. Cycline, p21, p27), antiapoptotischen Proteinen (z.B. Bcl-2), Tumorsuppressoren (z.B. p53), Transkriptionsfaktoren und Inhibitoren (z.B. NF-κB und IκB). Allgemein besteht die Wirkung von Bortezomib in einem antiproliferativen, proapoptotischen und antiangiogenen Effekt, der in der Therapie von Neoplasien genutzt werden kann (siehe Abb.2) (Boccardo et al., 2005).

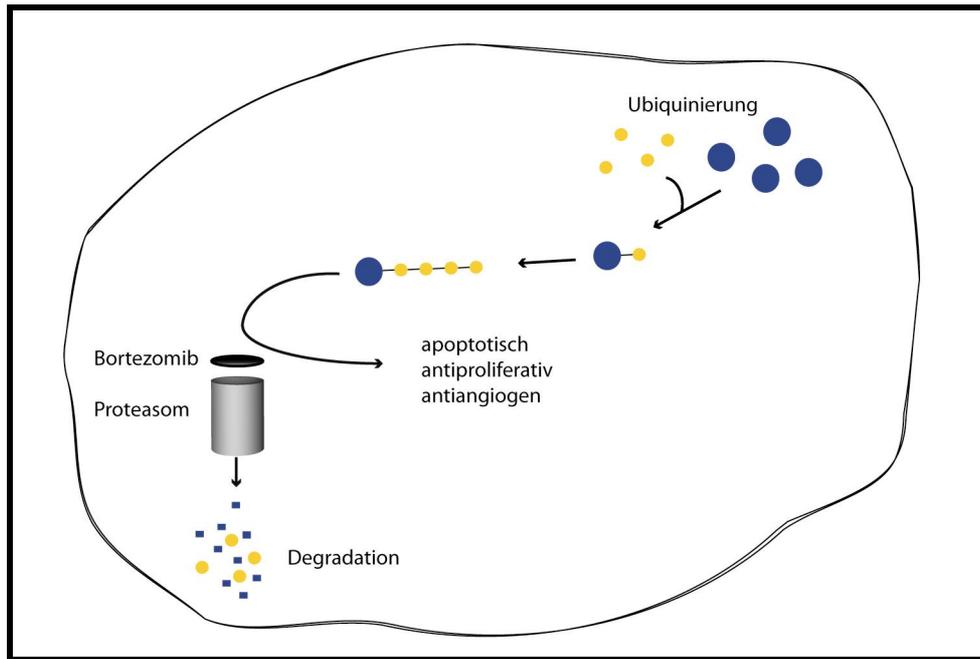


Abb.2: Molekularer Wirkmechanismus von Bortezomib

Dargestellt ist die enzymatische Markierung von Proteinen (blau) mittels Ubiquitin (gelb). Bortezomib verhindert die proteasomale Degradation polyubiquinierter Proteine mit der Folge einer intrazellulären Anhäufung dieser Proteine (modifiziert nach http://journals.prous.com/journals/dof/20022711/html/df271079/images/Bortezomib_f2.jpg. Stand: 07.11.08).

2.2.1 Bortezomib und das multiple Myelom

Auf Grund von Theorien über eine mögliche proapoptotische Wirkung, die durch die Hemmung des Proteasoms zu erzielen ist, wurde der später in Bortezomib unbenannte Proteasomen-Inhibitor PS-341 entwickelt. Innerhalb einer in vitro Screening-Versuchsreihe des National Cancer Institute (NCI) erwies sich PS-341 auch in der Praxis als potenter Inhibitor des Proteasoms mit einer beträchtlichen zytotoxischen Wirkung (Adams et al., 1999). Hideshima et al. konnten daraufhin in vitro eine direkte antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf unterschiedliche multiple Myelomzelllinien demonstrieren (Hideshima et al., 2001). In einer weiterführenden präklinischen in vivo Studie wurde die antimyeloische Wirkung von PS-341 anhand eines xenographen Mausmodells untersucht. Hier zeigte sich nicht nur eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums, sondern auch eine signifikante Zunahme der Überlebenszeit (30 Tage gegenüber 14 Tage) (LeBlanc et al., 2002). Innerhalb einer klinischen Phase I Studie mit an hämatologischen Neoplasien erkrankten Patienten konnte ein antitumoröser Effekt gegen ursprünglich therapieresistente Plasmazeldyskrasien belegt werden (Orlowski et al., 2002b). Im weiteren Verlauf wurden zwei multizentrisch angelegte Phase II Studien durchgeführt. Bei der sogenannten SUMMIT Studie, in die 202 stark vorbehandelte Patienten mit rezidiviertem

multiplen Myelom eingeschlossen wurden, betrug die Ansprechrate 35% mit einer medianen Überlebenszeit von 16 Monaten (Richardson et al., 2003). In der kleineren CREST Studie, die 54 weniger stark vorbehandelte Patienten einschloss, konnte in gleicher Dosierung eine 38%ige Ansprechrate erzielt werden (Jagannath et al., 2004). Das Nebenwirkungsprofil von Bortezomib beinhaltet u.a. das Auftreten von Polyneuropathien, Thrombozytopenien, Neutropenien und gastrointestinalen Beschwerden, gilt aber als insgesamt vertretbar (Richardson et al., 2003; Jagannath et al., 2004). Diese Erfolge führten 2003 - wie zuvor bereits erwähnt - zu einer beschleunigten Zulassung von Bortezomib durch die FDA (United States Food and Drug Administration) und EMEA (European Medicines Agency) (Montagut et al., 2005). Die erstmalige Zulassung wurde zur Monotherapie des multiplen Myeloms in der Behandlung von Patienten mit Rezidiv, die mindestens zwei vorangegangene Therapien durchlaufen haben, gewährt (Bross et al., 2004). Die FDA erweiterte die Zulassung 2006 zur Monotherapie nach Rezidiv mit einmalig vorangegangener Therapie (Kane et al., 2006). Grund waren die Ergebnisse einer international angelegten Phase III Studie, der sogenannten APEX Studie, innerhalb derer Patienten mit rezidiertem multiplen Myelom randomisiert entweder hochdosiertes Dexamethason oder Bortezomib erhielten. Es zeigten sich eine signifikant längere Zeit bis zum Fortschreiten (Time To Progression), eine höhere Ansprechrate und eine verlängerte Überlebenszeit in der Behandlung mit Bortezomib. Die mediane Überlebenszeit betrug ungefähr 30 Monate für Bortezomib und ungefähr 24 Monate für Dexamethason (Richardson et al., 2007). Seit Juni 2008 ist Bortezomib, basierend auf einer internationalen, multizentrischen Studie mit Patienten, die an unbehandeltem multiplen Myelom litten, durch die FDA zur Initialtherapie zugelassen. In dieser Studie erhielten die Patienten randomisiert entweder nur Melphalan mit Prednisolon oder zusätzlich zu dieser Kombination Bortezomib. Die Studie wurde vorzeitig abgebrochen, nachdem sich eine signifikante Verbesserung der Zeit bis zum Fortschreiten (Time To Progression) von ungefähr 15 auf 21 Monate durch die Hinzunahme von Bortezomib abzeichnete (FDA, 2008).

2.2.2 Kombinationstherapie

Neoplasien wie das multiple Myelom zeichnen sich durch eine enorme Heterogenität und hohe Mutationsrate aus, die zu einer genetischen und phänotypischen Instabilität führt (King und Nelson, 1989; Guikema *et al.*, 2004). Aus dieser Instabilität erwachsen mitunter unterschiedliche Überlebensstrategien, die die Tumorzelle vor einer gesunden Proliferationskontrolle schützen können, d.h. Tumorprogress, Proliferation und Metastasierung können durch multiple Mutationen und antiapoptotische Signalwege unterhalten werden. Zusätzlich begünstigt die hohe Mutationsrate die Entstehung primärer und sekundärer Resistenzen. Durch die Kombination verschiedener Chemotherapeutika mit unterschiedli-

chen Wirkmechanismen und Angriffspunkten kann versucht werden, eine verbesserte antitumoröse Wirkung zu erzielen und der Ausbildung von Resistenzen vorzubeugen (Jackmann, 2004).

Vor diesem Hintergrund werden Bortezomib beinhaltende Kombinationschemotherapien innerhalb klinischer Studien untersucht (Richardson *et al.*, 2006). Wie ausführlicher in der Diskussion besprochen wird, geschieht dies meist, ohne dass die jeweiligen Kombinationsregime präklinisch *in vitro*, d.h. in Zellkultur, auf ihre Effektivität hin geprüft wurden. Auch mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kombinationsregimen aus Bortezomib mit Dexamethason und Cyclophosphamid wurden trotz der geringen präklinischen Datenlage bereits klinische Studien durchgeführt (Jagannath *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2007; Ozaki *et al.*, 2007; Srikanth *et al.*, 2008). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Kombinationspartner Dexamethason und Mafosfamid einleitend beschrieben.

2.3 Dexamethason

Dexamethason ist ein synthetisches, langwirksames Glukokortikoid aus der Klasse der Steroidhormone, die Bestandteil der Nebennierenrindenhormone sind. Im Jahr 1949 wurde das erste Mal von der klinisch anwendbaren antirheumatischen Wirkung dieser Substanzgruppe berichtet (Kohl, 2001). Bereits ein Jahr später wurde in diesem Zusammenhang der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen (Raju, 1999). In der Hoffnung, die nebenwirkungsreiche mineralokortikoide Wirkung zu reduzieren und die antiphlogistische Wirkung zu steigern, erfolgte die Einführung von Prednison und Prednisolon durch die Firma Schering (Herzog und Oliveto, 1992). Daraufhin wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Präparate, wie auch das Dexamethason, entwickelt. Eine besonders effektive Modifikation des Steroidgerüsts stellte die Einführung eines Fluoratoms in 9 α -Position dar (siehe Abb.3). Diese und andere Molekülvariationen führen bei Dexamethason zu einer um den Faktor 30 gesteigerten glukokortikoiden Aktivität bei fast fehlender mineralokortikoider Wirkung (Forth *et al.*, 2001; Mutschler *et al.*, 2001). Hierdurch ist es möglich, fast ohne Störung des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes die klinisch gewünschte antiphlogistische und immunsuppressive Wirkung zu nutzen.

Glukokortikoide im Allgemeinen sind fester Bestandteil therapeutischer Strategien in der Behandlung maligner lymphatischer und hämatologischer Erkrankungen (Gaynon und Carrel, 1999; Younes, 2004; Mitchell *et al.*, 2005; Horning, 2007). Unter anderem werden

sie in der Therapie des multiplen Myeloms verwendet (Juge-Morineau et al., 1996; Paule et al., 1998). Die klassischen Therapieregime des multiplen Myeloms beinhalten Dexamethason oder Prednisolon in Kombination mit anderen Chemotherapeutika (Alexanian et al., 1986; Anonymus, 1998). Genannt seien die vormals erwähnten Kombinationen aus Melphalan mit Prednisolon (Alexanian-Schema) und die Kombination aus Vincristin, Doxorubicin mit Dexamethason (VAD-Schema) (Samson et al., 1989).

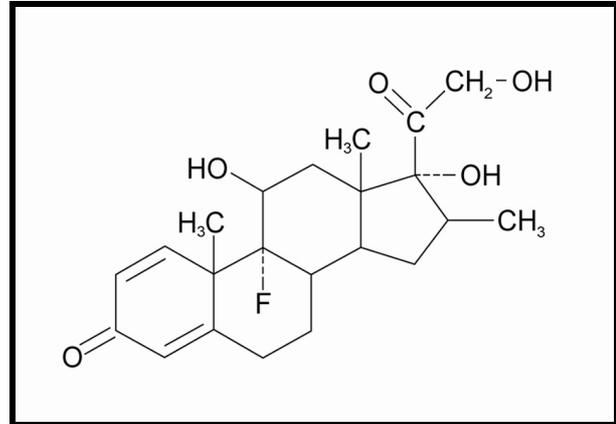


Abb.3: Strukturformel von Dexamethason (Lüllmann et al., 2003)

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung über unterschiedliche Mechanismen. Prinzipiell wird derzeit zwischen einem

genomischen und einem nicht genomischen Wirkmechanismus unterschieden (Buttgereit, 2001). Die genomische Wirkung erfolgt nach Bindung eines zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptors und Bildung eines aktiven Steroid-Rezeptor-Komplexes. Dieser Komplex reguliert nach Translokation in den Zellkern die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene, die Gegenstand aktueller Forschung sind (Geley et al., 1996; Chauhan et al., 2002). Hierdurch inhibieren oder fördern Glukokortikoide beispielsweise die Expression verschiedener Zytokine, Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle. Dies geschieht über direkte Interaktion mit den „glucocorticoid response elements“ in der Promotorregion von Genen oder in der Modifikation der Wirkung von Transkriptionsfaktoren (Barnes, 1998; Hayashi et al., 2004). Obwohl dieser genomische Mechanismus wahrscheinlich den meisten Wirkungen der Glukokortikoide unterliegt, wird auch von einem schneller wirkenden nicht genomischen Wirkmechanismus ausgegangen. Dieser ist bisher jedoch nicht gut verstanden. Man geht davon aus, dass Glukokortikoide direkt über Interaktion mit Membranlipiden, Membranproteinen und zytosolischen Proteinen wirken können (Buttgereit und Scheffold, 2002; Haller et al., 2008).

Die molekularen Mechanismen, mit denen Glukokortikoide ihre proliferationshemmende Wirkung auf lymphatische Malignome ausüben, sind äußerst komplex. Chauhan et al. konnten mittels DNA-Mikroarray Untersuchungen zeigen, dass das Expressionsmuster von unbehandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Glukokortikoiden behandelt wurden, deutlich verändert war. Dieser Umstand konnte im weiteren Verlauf durch ver-

schiedene Arbeitsgruppen bestätigt werden (Chauhan et al., 2002; Schmidt et al., 2004; Ploner et al., 2005).

2.4 Mafosfamid

Mafosfamid ist ein Derivat des aktiven Cyclophosphamidmetaboliten 4-OH Cyclophosphamid, wobei Cyclophosphamid zu den klassisch alkylierenden Zytostatika aus der Gruppe der Oxazaphosphorine gezählt wird. Alkylantien sind hochreaktive Substanzen, die Alkylgruppen an organische Moleküle binden können. Es handelt sich um eine Stoffgruppe, die mit Stickstoff-Lost, einem Derivat des Senfgases (Lost), eng verwandt ist. In der Absicht, geeignete Chemotherapeutika mit weniger Nebenwirkungen zu etablieren, wurde die Gruppe der Oxazaphosphorine entwickelt (Brock, 1989). Einer ihrer ersten und bedeutendsten Vertreter ist das Cyclophosphamid. Cyclophosphamid ist ein sogenanntes Prodrug. Das bedeutet, dass die pharmakologisch aktive Form dieser Substanz erst nach enzymatischer Aktivierung durch mischfunktionelle Oxidasen der Leber entsteht (Huang et al., 2000). Das daraus hervorgehende 4-OH Cyclophosphamid steht mit der ringoffenen Form, dem Aldophosphamid, im Gleichgewicht. Aldophosphamid spaltet sich spontan in Acrolein und die am stärksten alkylierende Verbindung, das sogenannte Phosphoramid-Mustard (siehe Abb.4) (Colvin et al., 1973). Acrolein wird für die therapie-limitierenden, urotoxischen Nebenwirkungen verantwortlich gemacht, welche sich in der Behandlung mit Oxazaphosphorinen herausstellten. Durch prophylaktische Kombination der Oxazaphosphorine mit 2-Mercaptoethansulfonat (Mesna) kann Acrolein gebunden und unschädlich gemacht werden (Brock und Pohl, 1986).

Die vorliegende Arbeit untersucht in Anlehnung an klinische Studien, die mit Cyclophosphamid durchgeführt wurden, die Wirksamkeit von Mafosfamid. Mafosfamid entstand in der pharmakologischen Weiterentwicklung von Cyclophosphamid. Es enthält direkt integriert in seine chemische Struktur Mesna und zeichnet sich durch einen spontanen Zerfall in den aktiven Metaboliten von Cyclophosphamid (4-OH Cyclophosphamid) und Mesna aus (siehe Abb.4). Da durch den spontanen Zerfall eine enzymatische Aktivierung in der Leber nicht mehr notwendig ist, kann Mafosfamid - wie in der vorliegenden Arbeit - direkt zur Untersuchung von Zellkulturen verwendet werden (Brock, 1989).

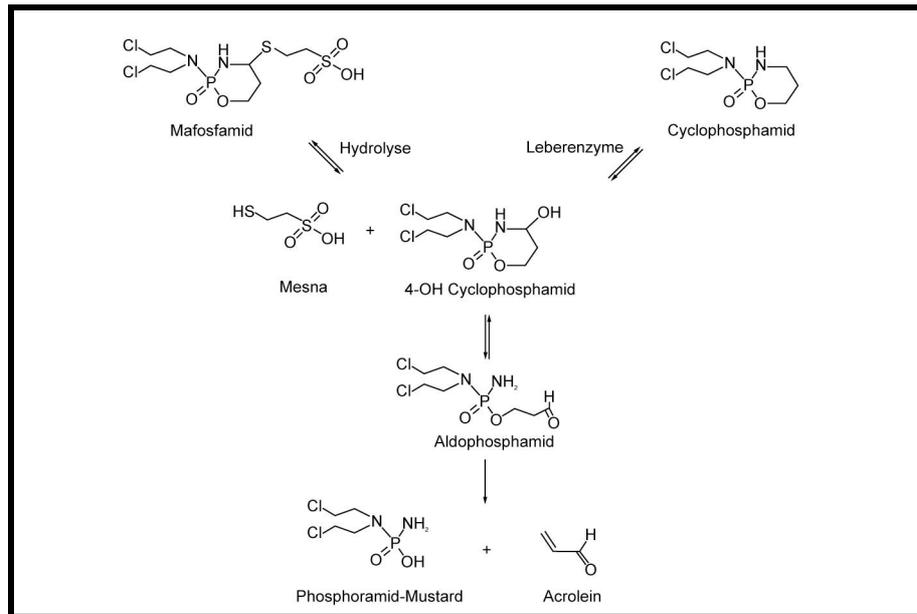


Abb.4: Metabolisierung von Mafosfamid und Cyclophosphamid

Dargestellt ist die Metabolisierung von Mafosfamid und Cyclophosphamid, wobei Mafosfamid spontan hydrolysiert und Cyclophosphamid enzymatisch in 4-OH Cyclophosphamid umgewandelt wird (Blaney *et al.*, 2005).

Cyclophosphamid findet eine breite medizinische Anwendung. Viele hämatologische und solide Neoplasien werden mit Kombinationschemotherapien behandelt, deren Bestandteil Cyclophosphamid ist. Beispielhaft sei hier die Anwendung in der Therapie von Lymphomen, Leukämien, Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen sowie des multiplen Myeloms erwähnt (Aisner *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008; Michallet und Coiffier, 2008; Wolowacz *et al.*, 2008). Des Weiteren ist Cyclophosphamid von besonderer Bedeutung im Rahmen der Hochdosistherapie mit nachfolgender Stammzelltransplantation, bei der vor einer Stammzelltransplantation eine sogenannte Konditionierung mit extrem hohen Dosen Cyclophosphamid durchgeführt wird (Kim *et al.*, 2007).

Obwohl viele zelluläre Bestandteile alkyliert werden können, liegt der Hauptmechanismus der zytotoxischen Wirkung von Alkylantien in ihrer Fähigkeit, Nukleinsäure zu vernetzen (Wagner *et al.*, 1997). Durch die Übertragung von Alkylgruppen entstehen kovalente Bindungen (crosslinks) zwischen Basenpaaren der DNA. Diese Vernetzungen können sich innerhalb des gleichen Stranges der DNA-Doppelhelix (intrastrand crosslinks) mit dem gegenüberliegenden Strang (interstrand crosslink) und mit Proteinen (DNA-Protein cross link) ausbilden. Weiterhin werden im Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung von Alkylantien Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA beobachtet (Kohn, 1996). In Studien mit dem aktiven Hydroxymetabolit von Cyclophosphamid konnte das Vorhandensein von

Längsverbindungen (interstrand cross links) und DNA-Protein Verbindungen (DNA-Protein cross links) nachgewiesen werden (Crook et al., 1986). Letztendlich können die Schäden an der DNA komplexe Signalkaskaden induzieren, die die Zelle in den programmierten Zelltod führt (Green, 1998).

2.5 Fragestellung

Das multiple Myelom bleibt weiterhin eine hämatologische Erkrankung mit einer kurzen Überlebenszeit. Die schlechten Ansprechraten der konventionellen Chemotherapien und die hohen Rezidivraten in der Hochdosistherapie führen notwendigerweise zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten. Die bisherigen Ergebnisse für Bortezomib, einem Vertreter der neuartigen Proteasomen-Inhibitoren, sind vielversprechend und zeigen insbesondere Wege in der Behandlung älterer Patienten auf, die keine Hochdosistherapie tolerieren können. In der Kombination von Bortezomib mit klassischen Chemotherapeutika, wie Dexamethason und Cyclophosphamid, besteht eventuell die Möglichkeit, die Erfolge in der Behandlung mit Bortezomib weiter zu verbessern. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kombination von Bortezomib mit Dexamethason und Cyclophosphamid wurden bereits klinische Studien durchgeführt, ohne dass diese Kombination vorher in vitro evaluiert wurde. Die vorliegende Arbeit steht in der Absicht, diese Lücke zu füllen und eine Basis zu bieten, um die Ergebnisse und Hintergründe der klinischen Studien fachgerecht diskutieren zu können. Die verfolgte Arbeitshypothese geht der Frage nach, ob in der Behandlung von multiplen Myelomzellen in vitro die Kombination von Bortezomib mit Mafosfamid und Dexamethason einen Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Bortezomib bietet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien und Puffer

Reagenzien und Puffer	Bezugsquelle
<i>Apoptose-Assay</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I enthält: <ul style="list-style-type: none"> - Annexin V-FITC (100 Tests) - Propidiumjodid (2 ml) - Annexin V Binding Buffer (50 ml) ▪ Destilliertes Wasser ▪ PBS (Phosphate Buffered Saline) Puffer 	<p>BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)</p> <p>DeltaSelect GmbH (München)</p> <p>Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)</p>
<i>Proliferationsassay</i>	
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
<i>Sonstige Reagenzien</i>	
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

3.1.2 Medien und Zusätze

Medien und Zusätze	Bezugsquelle
<i>Medien</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Einfriermedium cryo-safe 1 ▪ Medium RPMI 1640 	<p>c-c-pro GmbH (Oberdorla)</p> <p>Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien, ehemals Bio Whittaker Europe)</p>
<i>Zusätze</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fetales Kälberserum ▪ Penicillin-Streptomycin 	<p>Biochrom AG (Berlin)</p> <p>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</p>

3.1.3 Labormaterial

Labormaterial	Bezugsquelle
96-Loch-Mikrotiterplatten	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)
Dispenserspritzen, Compitips plus Biopur (0,5 ml, 1 ml, 5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg)
Einfrierröhrchen, Cryo Tube Vials (1,8 ml)	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)
Einmalkanülen, BD Microlance 3	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipettenspitzen (0,2 ml, 1 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Polystyrene Round-Bottom Tube (16 ml)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Reagenzröhrchen (5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Reagiergefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg)
Serological Pipet, Cellstar (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Spritzen, BD Discardit II (5 ml)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen, Nunclon Surface	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)

3.1.4 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
<i>Absorptionsphotometrie</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Spektralphotometer für Mikrotiterplatten, Revelation 4.22 	Dynex Technologies GmbH (Berlin)
<i>Durchflusszytometrie</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Durchflusszytometer, Cytomics FC500 ▪ Schüttler, MS2 Minishaker 	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld) IKA-Werk GmbH & Co. KG (Staufen)

Zellkultur

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ▪ Brutschrank | Heraeus Holding GmbH (Hanau) |
| ▪ Mikroskop, Typ ID03 | Carl Zeiss AG (Oberkochen) |
| ▪ Neubauer Zählkammer | Karl Hecht KG "Assistent" (Sondenheim/Rhön) |
| ▪ Pipetus | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt) |
| ▪ Sterilbank, Typ BSB 4A | Gelaire (Sydney, Australien) |
| ▪ Stickstoffbehälter | Cryson GmbH (Schöllkrippen) |
| ▪ Wasserbad, Typ 1003 | GFL GmbH (Burgwedel) |
| ▪ Zentrifuge, Sepatech Megafuge 1,0 | Heraeus Holding GmbH (Hanau) |

Sonstige Geräte

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| ▪ Elektronische Waage, Typ 1712MP8 | Sartorius AG (Göttingen) |
| ▪ Ultraschallbad, Sonorex TK52 | Bandelin GmbH & Co. KG (Berlin) |
-

3.1.5 Zytostatika

3.1.5.1 Bortezomib (Velcade®)

Bezugsquelle: Millennium Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, USA)

Summenformel: $C_{19}H_{25}BN_4O_4$

Eine Durchstechflasche mit Pulver zum Herstellen einer Injektionslösung enthält 3,5 mg Wirkstoff mit einem Molekulargewicht von 384.24. Restbestände des stationären Gebrauchs wurden zu je 20 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor Behandlung der Zellen wurde das Medikament im Wasserbad bei 37°C für 3 Minuten aufgetaut. Die verschiedenen Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit Medium hergestellt.

3.1.5.2 Dexamethason (Fortecortin®)

Bezugsquelle: Merck KGaA (Darmstadt)

Summenformel: $C_{22}H_{29}FO_5$

Verwendet wurden Ampullen mit Injektionslösung entsprechend 4 mg, 8 mg und 32 mg. Das Molekulargewicht beträgt 392.46. Die Ampullen wurden bei Raumtemperatur gelagert. Um die geeignete Konzentration für die Versuche zu erstellen, wurde der Inhalt der Ampullen direkt mit Medium verdünnt.

3.1.5.3 Mafosfamid

Bezugsquelle: NIOMECH, Teil von IIT GmbH (Bielefeld)

Summenformel: $C_9H_{18}Cl_2N_2O_5PS_2 \times C_6H_{14}N$

Das verwendete Mafosfamid-Cyclohexamin-Salz besitzt ein Molekulargewicht von 500.45 und wurde bei 4°C trocken gelagert. Für die Versuche wurde das pulverförmige Zytostatikum in Mengen zu 2 µg aufgeteilt. Kurz vor Behandlung der Zellen wurde Mafosfamid durch Verdünnung mit Medium entsprechend konzentriert und anschließend für 3 Minuten ins Ultraschallbad gestellt.

3.1.6 Zelllinien

Beide nicht adhärent wachsende Zelllinien wurden uns freundlicherweise vom UK-SH Campus Kiel, Sektion für Stammzelltransplantation (unter Leitung von Prof. Dr. med. Martin Gramatzki), zur Verfügung gestellt.

3.1.6.1 L-363

L-363 ist eine Zelllinie, die 1977 aus dem Blut einer 36 Jahre alten Frau mit Plasmazellleukämie (Typ IgG) gewonnen wurde (Diehl *et al.*, 1978). Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine in therapeutischen Dosen befindliche Sensibilität gegenüber Dexamethason aus (Juge-Morineau *et al.*, 1995).

3.1.6.2 OPM-2

Die Zelllinie OPM-2 wurde 1982 aus dem Blut einer 56 Jahre alten Frau mit multiplem Myelom (Typ IgG lambda) in leukämischer Phase gewonnen. Zusätzlich wurde aus dem Blut der gleichen Frau noch eine andere Zelllinie, nämlich OPM-1, etabliert. Beide Zelllinien unterscheiden sich in der Anordnung chromosomaler Aberrationen und hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Dexamethason. Die Zelllinie OPM-2 wird im Gegensatz zur Zelllinie OPM-1 als sensibel gegenüber Dexamethason beschrieben (Katagiri *et al.*, 1985; Gomi *et al.*, 1990; Juge-Morineau *et al.*, 1995).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Steriles Arbeiten

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurde streng darauf geachtet, die dafür nötigen Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Arbeitsfläche der Sterilbank und die Arbeitsmaterialien wurden vor Arbeitsbeginn mit 70% Ethanol gereinigt. Es wurden steril verpackte Einmalartikel benutzt und hitzebeständige Glasmaterialien wurden bei 2,2 bar (134°C) autoklaviert.

3.2.1.2 Kultivierung und Passagieren

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen unter keimfreien Bedingungen bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% O₂ in Kultur gehalten. Die Zusammensetzung des Kulturmediums bestand aus 450 ml Medium RPMI 1640, 50 ml fetalem Kälberserum und 1 ml Penicillin-Streptomycin. Das Passagieren erfolgte innerhalb von 3 - 5 Tagen. Hierfür wurden die Zellen in 50 ml Falkonröhrchen überführt und für 3 Minuten bei 1100 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet in Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Zu Beginn der Kultivierung wurden die Suspensionszellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml auf 1:2 oder 1:4 Kulturflaschen zu je 20 ml Medium ausgebracht.

3.2.1.3 Kryokonservierung

Um auf junge Passagen zurückgreifen zu können, wurden regelmäßig Passagen kryokonserviert. Hierfür wurde der Inhalt einer Zellkulturflasche in ein 50 ml Falkonröhrchen überführt, für 2 Minuten bei 1100 U/Min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 1,8 ml Einfriermedium cryo-safe 1 resuspendiert und in einer Konzentration von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden für 1 Stunde im Gefrierschrank bei -14°C, dann für 24 Stunden im Tiefkühlschrank bei -80°C gekühlt und schließlich bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingelagert. Um kryokonservierte Passagen wieder aufzutauen, wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgewärmt, in warmes Medium überführt und nach Entfernung des Einfriermediums durch zweimaliges Zentrifugieren unter gewohnten Bedingungen in Kultur gehalten.

3.2.2 Wachstumskurven

Es wurden mit beiden Zelllinien Wachstumskurven erstellt. Die Zellen wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingesät. Alle 24 Stunden wurde die Zellzahl mit der Neubauerzählkammer bestimmt und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Zur Prüfung der Vitalität wurde mit Trypanblau gefärbt.

3.2.3 WST-1 Assay

3.2.3.1 Prinzip

Für die Bestimmung der Zellüberlebensrate wurde der WST-1 Assay genutzt, mit dem die kolorimetrische Messung lebender Zellen aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität in Korrelation zur Zellzahl möglich ist. Es handelt sich um einen auf Tetrazoliumsalzen beruhenden Assay (Berridge *et al.*, 2005). Tetrazoliumsalze werden von mitochondrialen Dehydrogenasen NADH abhängig gespalten und zu farbigem Formazan reduziert (siehe Abb.5). Die Menge des entstandenen Formazans steht in Korrelation mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen und kann spektralphotometrisch bei 450 nm quantifiziert werden. Die mittels ELISA gemessene Absorption ist direkt proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven und somit lebendigen Zellen.

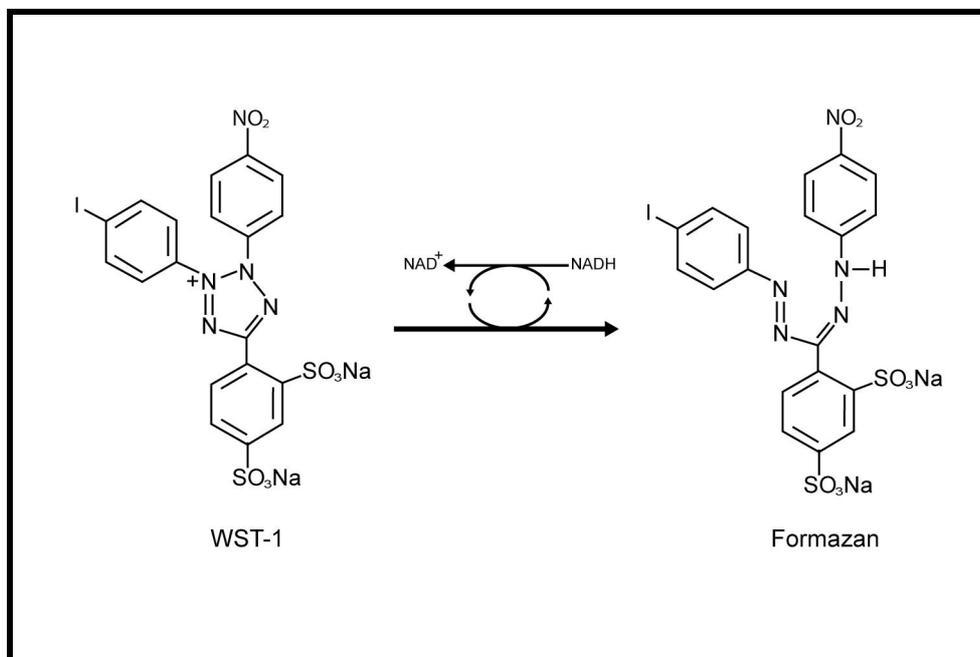


Abb.5: Prinzip des WST-1 Assays

WST-1 wird NADH abhängig zu farbigem Formazan reduziert und kann photometrisch bestimmt werden. Die gemessene Absorption ist proportional zur Anzahl lebendiger Zellen (Roche, 2007).

3.2.3.2 Wachstumsstudien

Um für den Versuchsaufbau die optimale Zellzahl bei Aussaat zu bestimmen, wurden mit dem WST-1 Assay Wachstumsstudien durchgeführt. Hierfür wurde die Extinktion von bei Aussaat 500, 1000, 2000, 5000 und 10000 Zellen/Well nach 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden photometrisch bestimmt. Am Tag der Messung wurde 20 µl WST-1 in die mit Zellen gefüllten Wells der 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion mit dem Photometer nach 1, 2, 3 und 4 Stunden gemessen. Für den Versuchsaufbau mit WST-1 betrug demnach die optimale Zellzahl bei Aussaat für OPM-2 5000 Zellen/Well und 10000 Zellen/Well entsprechend für L-363. Die Wachstumszeit vor Gabe von WST-1 betrug bei beiden Zelllinien 3 Tage. Die Inkubationszeit nach Zugabe von WST-1 betrug für OPM-2 4 Stunden und 2 Stunden für L-363.

3.2.3.3 Versuchsaufbau

Für die Durchführung der Versuche wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten angesetzt, die für die photometrische Bestimmung der Zellüberlebensrate mittels Spektrophotometer genutzt wurden. Hierfür wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in 50 ml Falconröhrchen überführt und nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1100 U/Min mit Medium resuspendiert. Dann wurde die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und durch Zugabe von Medium in die benötigte Zellkonzentration verdünnt (OPM-2 (5×10^4 Zellen/ml); L-363 (1×10^5 Zellen/ml)). Um die Proben vor Verdunstung zu schützen, wurden zuerst die randständigen Wells der 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 100 µl Medium gefüllt. Die Leerwerte erhielten 200 µl Medium und die Proben 100 µl Zellsuspension und 100 µl Medium. Die Absolute Zellzahl pro Well betrug für die Zelllinie OPM-2 5×10^3 Zellen/Well und entsprechend 1×10^4 Zellen/Well für die Zelllinie L-363. Eine Reihe bestand aus einem Leerwert und 6 Proben (siehe Abb.6). Zu Beginn wurde für jeden Versuch eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 5 Reihen angesetzt, die nicht behandelt wurden und als Kontrolle dienten. Zusätzlich wurden die 96-Loch-Mikrotiterplatten, die für die Behandlung bestimmt waren, vorbereitet (siehe Abb.6). Dann wurden die Zellen bei 37°C, 95% O₂ und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Vor der Behandlung wurden die verschiedenen Arbeitskonzentrationen der Zytostatikalösungen durch Verdünnung mit Medium erstellt. Die Behandlung der Proben erfolgte jeweils mit 10 µl dieser Zytostatikalösung. Nach Behandlung erfolgte eine weitere Inkubation für 48 Stunden. Jetzt schloss sich die Zugabe von 20 µl WST-1 pro Well und eine weitere Inkubation (OPM-2 (4 Std.); L-363 (2 Std.)) an. Im Anschluss wurde die Absorption mittels Spektrophotometer für Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für die Berechnung der Zellüberlebensrate siehe Kapitel 3.2.6.

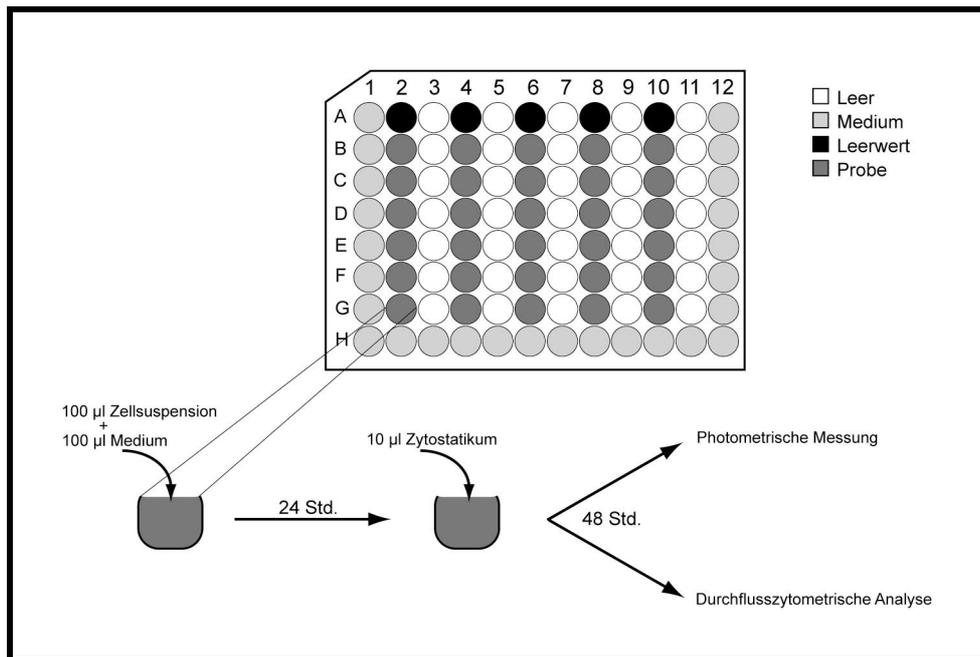


Abb.6: Versuchsaufbau für die photometrische Messung mit dem WST-1 Assay und der durchflusszytometrischen Analyse.

Die Zellen (OPM-2 (5×10^3 Zellen/Well); L-363 (1×10^4 Zellen/Well)) wurden in den Wells einer 96-Loch-Mikrotiterplatte für 24 Stunden inkubiert. Nach anschließender Behandlung mit den Zytostatika schloss sich eine weitere Inkubation für 48 Stunden an, bevor die photometrische Messung mit dem WST-1 Assay erfolgte. Der gleiche Versuchsaufbau wurde zur Vorbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung (siehe Kapitel 3.2.4) verwendet.

3.2.4 Durchflusszytometrie

3.2.4.1 Prinzip

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren der quantitativen Bestimmung von sowohl zellulären Oberflächenantigenen als auch von intrazellulären Markern. Die Quantifizierung erfolgt indirekt über die Detektierung von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern, welche spezifisch an den Zellen binden und durch einen Laser und die daraus resultierende Anregung nachweisbar sind. Die markierten Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Für die hydrodynamische Fokussierung wird die in einem Probenröhrchen befindliche Zellsuspension über eine Stahlkapillare in die Messküvette gesogen. Ein äußerer Strom, die Mantelflüssigkeit, wird zur Bewegung des inneren Stroms, der die Probe enthält, genutzt. Hierdurch werden die Zellen beim Eintreten in die Messkammer stark beschleunigt. Sie trennen sich auf und erreichen, wie an einer Perlschnurkette aneinandergereiht, sequentiell den Analysepunkt. Hier werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Laserstrahl angeregt. Nach dem Prinzip der Fluoreszenz werden die Elektronen des Fluores-

zenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Hierfür wird für einen fluoreszierenden Farbstoff ein charakteristischer Wellenlängenbereich, das sogenannte Absorptionsspektrum, verwendet. Nach Anregung fallen die Elektronen unter Abgabe von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die durch einen Photodetektor registrierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs und ist damit indirekt proportional zur Menge des zu quantifizierenden Zellmerkmals. Die von einem Fluoreszenzfarbstoff emittierten Photonen bilden ein spezifisches Emissionsspektrum. Unter Ausnutzung von Fluoreszenzfarbstoffen mit ähnlichen Absorptionsspektren und unterschiedlichen Emissionsspektren kann bei gleichzeitiger Messung eine Unterscheidung von unterschiedlichen Zellmerkmalen erfolgen. Das in dieser Arbeit verwendete Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I enthält Propidiumjodid (PI) und Fluoresceinisothiozyanat (FITC) markiertes Annexin V.

3.2.4.2 Annexin V-FITC Apoptose-Assay

Annexin V-FITC dient der prozentualen Quantifizierung von Zellen in unterschiedlichen Vitalitätszuständen, wobei zwischen der frühapoptotischen und spätapoptotischen Phase unterschieden wird. Innerhalb der frühapoptotischen Phase vollziehen sich verschiedene Veränderungen an den Zellen, wie die Translokation des Phosphatidylserins von der inneren Plasmamembran auf die äußere Oberfläche der Zelle. Annexin V ist ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Es kann daher sehr gut für die Detektierung von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche genutzt werden. Phosphatidylserin zeigt sich jedoch auch während der Zellnekrose, wenn es zum Verlust der Integrität der Zellmembran kommt. Aus diesem Grund wurde in diesem Assay ein weiterer Farbstoff, Propidiumjodid (PI), verwendet, der nur Zellen färbt, die nekrotisch sind oder sich in der späten Phase der Apoptose befinden. Die Zellmembran solcher Zellen ist nicht mehr intakt, so dass PI die innerhalb der Zelle befindliche Nukleinsäure färben kann. Nach dem Färbeverhalten der Zellen kann diskriminiert werden zwischen lebenden Zellen (Annexin negativ / PI negativ), frühapoptotischen Zellen (Annexin positiv / PI negativ) und spätapoptotischen, nekrotischen oder toten Zellen (Annexin positiv / PI positiv) (siehe Abb.7) (Vermes *et al.*, 1995).

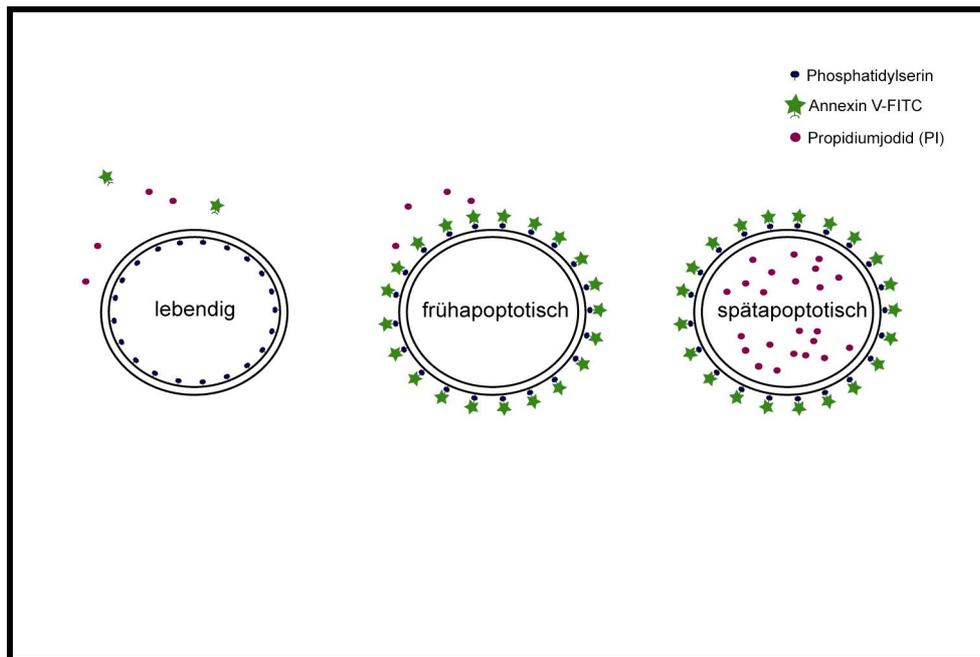


Abb.7: Prinzip des Annexin V-FITC Apoptose-Assays

Dargestellt ist die Färbung einer Zelle je nach ihrem Vitalitätszustand. In einem vitalen Zustand befindet sich das Phosphatidylserin innerhalb der Zelle. Frühapoptotisch kommt Phosphatidylserin auf die Oberfläche der Zelle und kann von Annexin V-FITC gebunden werden. Im spätapoptotischen Zustand ist die Integrität der Zellmembran aufgehoben, so dass Propidiumjodid binden kann. Lebendig (Annexin V negativ / PI negativ), frühapoptotisch (Annexin V positiv / PI negativ), spätapoptotisch (Annexin V positiv / PI positiv) (modifizierte nach <http://www.dundee.ac.uk/lifesciences FACS/ annexin.jpg>. Stand: 29.10.08).

3.2.4.3 Färbung und Messung

Die Vorbehandlung der L-363 Zellen entsprach dem in Abb.6 beschriebenen Versuchsaufbau. Es wurden 1×10^4 Zellen/Well in die Wells einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und nach 24 Stunden mit den IC50 von Bortezomib, Mafosfamid und Dexamethason behandelt. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Es wurden drei unbehandelte Proben als Kontrollen angesetzt. Eine unbehandelte Probe wurde nicht gefärbt, eine Probe erhielt nur Annexin V-FITC und eine Probe nur PI. Die behandelte Probe wurde mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Am Tag der Messung wurden die unbehandelten und behandelten Proben aus den Wells der Mikrotiterplatten in Probenröhrchen überführt und bei 1100 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Proben mit 200 μ l PBS Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 1100 U/Min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde zusätzlich zu 100 μ l Binding Buffer je nach Probe 5 μ l Annexin V-FITC und/oder 5 μ l PI in das Probenröhrchen pipettiert. Der Binding Buffer wurde zuvor mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt angesetzt. Die Probenröhrchen wur-

den für 1 Minute mit dem Schüttler gemischt und anschließend für 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Nun erhielt jede Probe 400 µl Binding Buffer und wurde anschließend bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb einer Stunde.

3.2.5 “Combination Index”

Der „Combination Index“ (CI) beruht auf einer Methode, die von Chou und Talalay entwickelt wurde. Sie dient der quantitativen Beschreibung einer Kombinationstherapie. CI=1 steht für einen additiven, CI<1 für einen synergistischen und CI>1 für einen antagonistischen Effekt einer Kombinationsbehandlung (Chou, 2006).

Die Berechnung des „Combination Index“ erfolgte mit dem Computerprogramm CalcuSyn (Biosoft) nach folgender Gleichung:

$$\text{“Combination Index”} = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$$

$(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ sind die Konzentrationen der Zytostatika, die allein jeweils eine x%ige Proliferationshemmung erzeugen. Für $(D)_1$ und $(D)_2$ stehen die Konzentrationen der Zytostatika, die jene x%ige Proliferationshemmung in Kombination erreicht. Die Proliferationshemmung wurde berechnet, indem die Zellüberlebensrate in % von 100% subtrahiert wurde.

3.2.6 Biometrie und Statistik

Die Analyse der Daten und die Generierung der statistischen Parameter (Mittelwert, Median, Quantile, Standardabweichung) erfolgte, wie die Erstellung der Graphiken, mit dem Computerprogramm Excel (Microsoft).

Für die Berechnung der Zellüberlebensrate wurde der Median der optischen Dichten der unbehandelten Kontrollen als 100% Zellüberleben gewertet. Der Median der optischen Dichten der behandelten Proben wurde im Vergleich zur Kontrolle in Prozent berechnet und so die Zellüberlebensrate bestimmt. Versuche mit Zellüberlebensraten, die um mehr

als 2 Standardabweichungen von der Gesamtheit der Versuche abwichen, wurden als Ausreißer betrachtet und nicht gewertet.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Zellüberlebensrate \%} = 100 \times \text{OD Probe} / \text{OD Kontrolle}$$

OD = optische Dichte

Bei den Kombinationsbehandlungen wurde zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). Da mehrere Vergleiche innerhalb eines Versuchs durchgeführt wurden, erfolgte die Neutralisierung der Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen nach der Bonferroni-Methode. Hiernach wurde das adjustierte Signifikanzniveau für multiples Testen angepasst, indem das ursprüngliche Signifikanzniveau von $p=0,05$ durch die Anzahl der Vergleiche geteilt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumskurven der Zelllinien L-363 und OPM-2

Wie in Abb.8 zu sehen, zeigen beide Zelllinien die typischen Phasen einer Wachstumskurve, bei der man eine Anlaufphase (Lag-Phase) von einer anschließenden Beschleunigungsphase (Log-Phase), in der ein exponentielles Wachstum vorliegt, unterscheiden kann. Die Wachstumskurven sind in Abb.8 bis zur stationären Phase, in der das Wachstum stagniert, gezeigt. Nicht dargestellt ist die Absterbephase.

Es zeigt sich für beide Zelllinien ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die anhand der Graphik bestimmte Verdopplungszeit innerhalb der Log-Phase beträgt für beide Zelllinien ca. 40 Stunden. Die in gleicher Weise bestimmten Zuwachsraten innerhalb von 24 Stunden ähneln sich für beide Zelllinien mit ca. $1,2 - 1,3 \times 10^5$ /ml Zellen pro 24 Stunden.

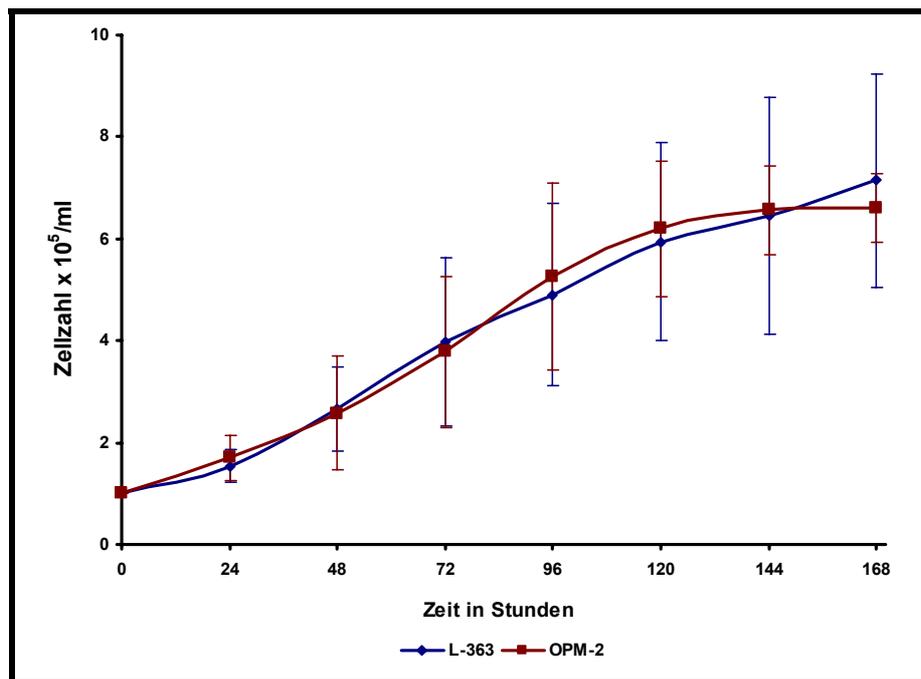


Abb.8: Wachstumskurven der Zelllinien L-363 und OPM-2

Dargestellt ist der Vergleich der Wachstumskurven der Zelllinien L-363 und OPM-2. Beide Zelllinien zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Alle 24 Stunden wurden die Zellkonzentrationen bestimmt. Der Mittelwert ($n=3$) und die Standardabweichungen der Zellkonzentrationen sind gegen die Zeit in Stunden abgebildet.

4.2 Dosisabhängige Zellüberlebensrate

Zur Bestimmung der dosisabhängigen Zellüberlebensrate von L-363 und OPM-2 wurde der in Kapitel 3.2.3.3 beschriebene Versuchsaufbau verwendet. Die Zellen wurden in aufsteigenden Konzentrationsreihen jeweils mit Bortezomib, Dexamethason oder Mafosfamid behandelt. Die Zellüberlebensraten wurden mit dem WST-1 Assay photometrisch bestimmt. Anhand dieser Daten wurde eine Konzentration ermittelt, die einer 50%igen Zellüberlebensrate gegenüber den unbehandelten Zellen entspricht. Hierbei handelt es sich um die sogenannte mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀). Die jeweiligen IC₅₀ sind in Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt.

4.2.1 Dosisabhängige Zellüberlebensrate für Bortezomib

Die Zelllinien L-363 und OPM-2 wurden mit Bortezomib in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (2 bis 10 nM) behandelt. Wie in Abb.9 dargestellt, zeigt sich für beide Zelllinien eine ähnliche dosisabhängige Zellüberlebensrate. Die anhand dieser Daten bestimmte IC₅₀ beträgt für beide Zelllinien 4,8 nM. Sie liegt hundertfach unterhalb der Plasmakonzentration nach intravenöser Gabe von 1,3 mg/m² Bortezomib, entsprechend der empfohlenen therapeutischen Dosierung (Millenium-Pharmaceuticals, 2006). Diese Ergebnisse bestätigen die Sensibilität multipler Myelomzellen für Bortezomib im nanomolaren Konzentrationsbereich (Servida et al., 2005).

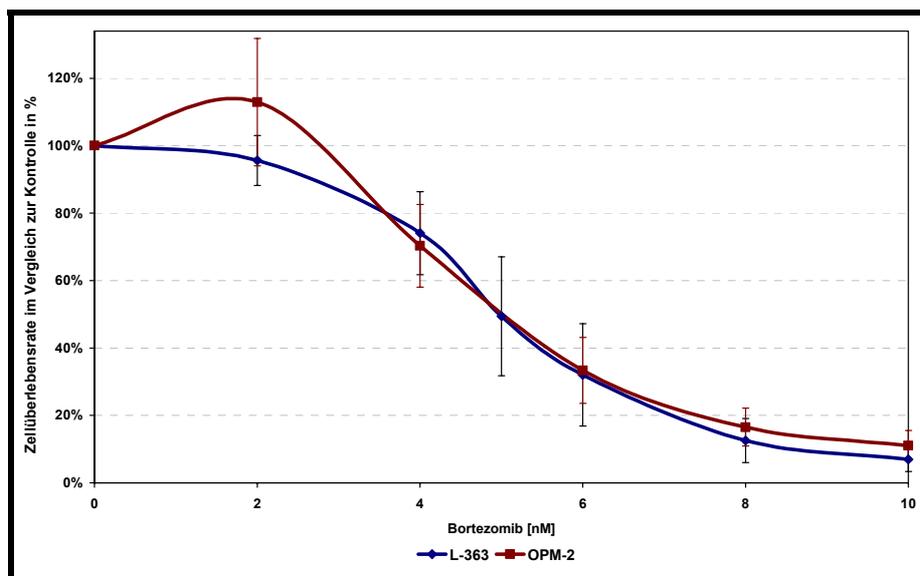


Abb.9: Behandlung der Zelllinien L-363 und OPM-2 mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Bortezomib

Dargestellt sind die Mittelwerte (L-363 (n=12); OPM-2 (n=16)) und Standardabweichungen der dosisabhängigen Zellüberlebensrate in %. Beide Zelllinien sind sensibel und zeigen eine ähnliche dosisabhängige Zellüberlebensrate. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch ermittelt.

4.2.2 Dosisabhängige Zellüberlebensrate für Dexamethason

4.2.2.1 L-363 behandelt mit Dexamethason

Für L-363 zeigt sich - wie in Abb.10 dargestellt - eine dosisabhängige Zellüberlebensrate, die sich innerhalb eines breiten Dosisbereiches (0,001 μM bis 1 μM) von Dexamethason befindet. Die ermittelte IC_{50} beträgt 0,06 μM und liegt innerhalb der therapeutischen Plasmakonzentration von Dexamethason nach intravenöser Gabe von 20 mg Dexamethason (Rohdewald et al., 1987). Ferner konnten die Ergebnisse einer anderen Arbeit bestätigt werden, in der sich L-363 bereits als sensibel gegenüber Dexamethason gezeigt hat (Juge-Morineau et al., 1995).

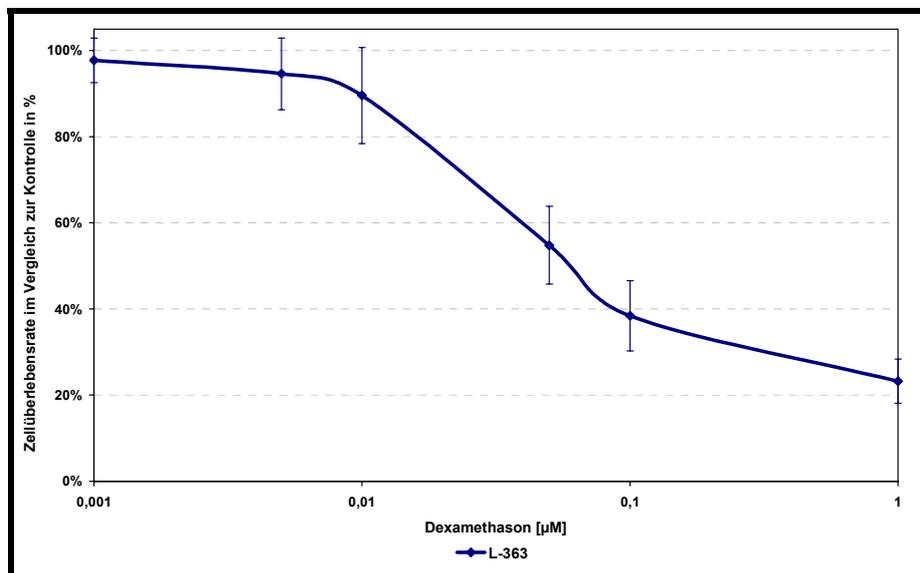


Abb.10: Behandlung der Zelllinien L-363 mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Dexamethason

Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=11$) und Standardabweichungen der dosisabhängigen Zellüberlebensrate in %. L-363 zeigt sich innerhalb eines breiten Dosisbereiches sensibel. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch ermittelt. Die Abszissenachse ist logarithmisch eingeteilt.

4.2.2.2 OPM-2 behandelt mit Dexamethason

Wie in Abb.11 dargestellt, zeigt sich die Zelllinie OPM-2 bis in hohe Konzentrationsbereiche (62,5 μM bis 1 mM) hinein resistent gegenüber der Behandlung mit Dexamethason. Somit konnten die Ergebnisse anderer Arbeiten, bei denen sich OPM-2 sensibel zeigte, nicht bestätigt werden (Gomi et al., 1990; Juge-Morineau et al., 1995). Da es zu keiner Reduktion der Zellüberlebensrate unter Einfluss von Dexamethason kam, war es nicht möglich, eine IC_{50} zu bestimmen. Anhand der vorliegenden Daten könnte auf eine proliferationsfördernde Wirkung von Dexamethason auf die Zelllinie OPM-2 geschlossen wer-

den. Um diese Wirkung in Kombination mit den anderen Zytostatika zu untersuchen, wurde eine hohe Konzentration (1 mM) für weitere Kombinationsversuche genutzt. Diese Konzentration befindet sich innerhalb der pharmakologisch therapeutisch erreichten Plasmakonzentration nach intravenöser Gabe von 20 mg Dexamethason (Rohdewald et al., 1987).

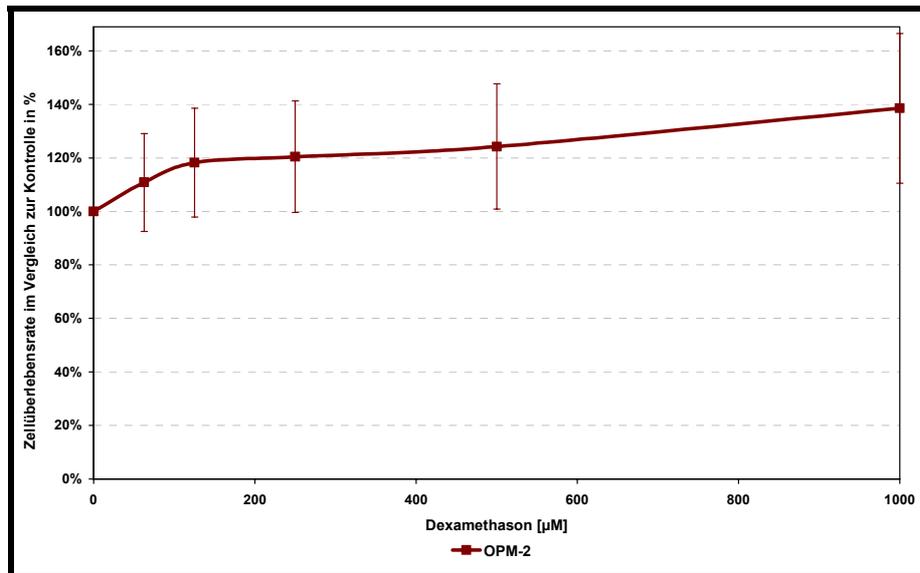


Abb.11: Behandlung der Zelllinien OPM-2 mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Dexamethason

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=16) und Standardabweichungen der dosisabhängigen Zellüberlebensrate in %. Die Zelllinie OPM-2 ist bis in hohe Dosisbereiche hinein resistent gegenüber Dexamethason. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch ermittelt.

4.2.3 Dosisabhängige Zellüberlebensrate für Mafosfamid

Beide Zelllinien wurden mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Mafosfamid (L-363 (0,375 bis 12 µM), OPM-2 (2 bis 10 µM)) behandelt. In Abb.12 sind die dosisabhängigen Zellüberlebensraten in der Behandlung mit Mafosfamid dargestellt. Die IC50 für die Zelllinie L-363 beträgt 3,8 µM und 7,1 µM entsprechend für die Zelllinie OPM-2. Diese Konzentrationen liegen innerhalb der Blutkonzentrationen von 4-OH Cyclophosphamid, gemessen nach intravenöser Infusion von 50 - 60 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid (Schuler et al., 1987; Schuler et al., 1991).

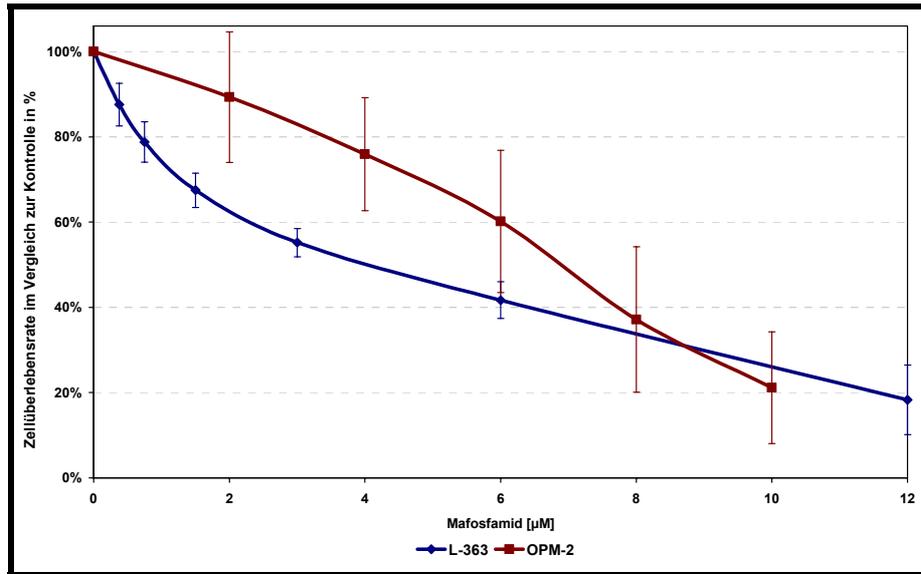


Abb.12: Behandlung der Zelllinien L-363 und OPM-2 mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Mafosfamid

Dargestellt sind die Mittelwerte (L-363 (n=14); OPM-2 (n=19)) und Standardabweichungen der dosisabhängigen Zellüberlebensrate in %. Beide Zelllinien sind innerhalb eines ähnlichen Konzentrationsbereiches sensibel für Mafosfamid. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch ermittelt.

Tabelle 2: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten IC50

Zelllinie	Bortezomib	Mafosfamid	Dexamethason
OPM-2	4,8 nM	7,1 µM	Nicht sensibel
L-363	4,8 nM	3,8 µM	0,06 µM

4.3 Durchflusszytometrische Analyse

Da es sich bei dem WST-1 Assay um eine unspezifische Messung der Zellüberlebensrate handelt, wurde mit dem Annexin V-FITC Apoptose-Assay geprüft, ob die Zytostatika eine spezifische proapoptotische Wirkung erzielen. Die Zellen wurden hierfür - wie im Kapitel 3.2.4.2 beschrieben - durchflusszytometrisch analysiert und hinsichtlich ihres apoptotischen Verhaltens unter Behandlung mit den IC50 der Zytostatika untersucht.

Aufgrund technischer Schwierigkeiten, die im Zusammenhang mit der extrem niedrigen absoluten Zellzahl von 5×10^3 Zellen/Well zu sehen sind, konnte die durchflusszytometrische Analyse mit der Zelllinie OPM-2 nicht erfolgreich durchgeführt werden.

In Abb.13 ist die durchflusszytometrische Analyse der Zelllinie L-363 dargestellt. Hierbei zeigt sich in der Behandlung mit Bortezomib, Mafosfamid und Dexamethason eine Zunahme apoptotischer Zellen. Insgesamt befinden sich nach Behandlung prozentual mehr Zellen in der Früh- als in der Spätapoptose.

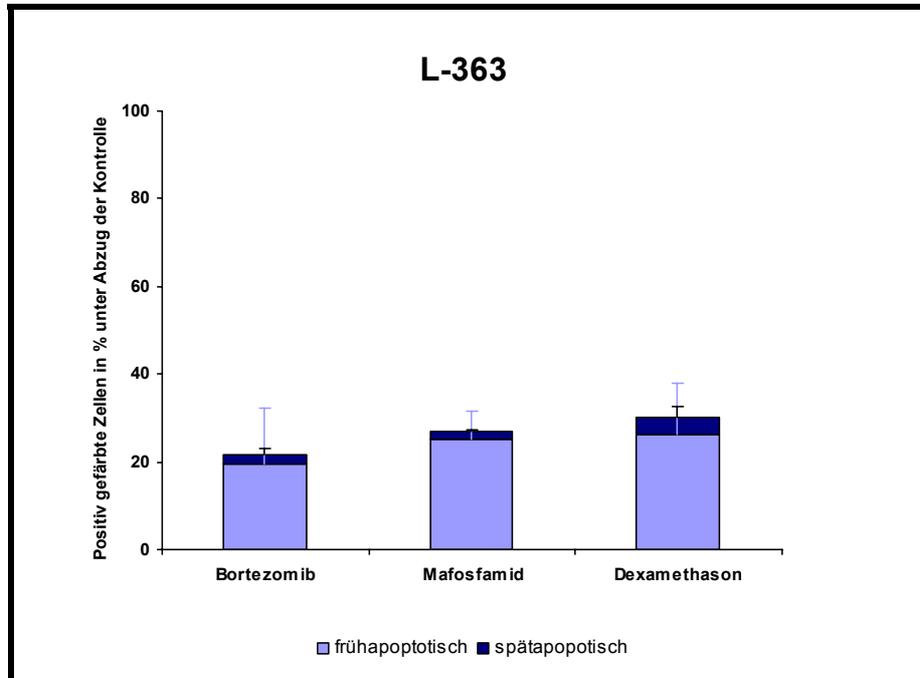


Abb.13: Durchflusszytometrische Analyse der Zelllinie L-363 behandelt mit den IC50 von Bortezomib, Mafosfamid und Dexamethason

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen der prozentualen Anteile frühaoptotischer und spätaoptotischer Zellen. Unter Behandlung mit den Zytostatika zeigt sich eine Zunahme apoptotischer Zellen, wobei der Anteil frühaoptotischer größer ist, als der spätaoptotischer Zellen. Die Bestimmung erfolgte durchflusszytometrisch mit dem Annexin V-FITC Apoptose-Assay. (Bortezomib=4,8 nM, Mafosfamid=3,8 µM, Dexamethason=0,06 µM)

4.4 Vergleich der Einzel- und Kombinationsbehandlungen

Um mögliche agonistische sowie antagonistische Wirkungen der Kombinationsbehandlungen übersichtlich darzustellen, wurden beide Zelllinien mit den IC50 behandelt. Es erfolgte der Vergleich der Einzel- und Kombinationsbehandlungen, wobei das Hauptmerk auf die Kombinationen von Bortezomib mit Dexamethason und/oder Mafosfamid gerichtet wurde.

4.4.1 Kombinationsbehandlung mit einer Konzentrationsreihe

Für einen Vergleich der Kombinationsbehandlungen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen von Bortezomib wurde die Zelllinie L-363 verwendet, da sich die Zelllinie OPM-2 gegenüber Dexamethason resistent gezeigt hat. Hierfür wurde die Zelllinie L-363

mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (2 bis 10 nM) von Bortezomib behandelt. Diese wurde mit den IC50 Konzentrationen von Mafosfamid und Dexamethason kombiniert.

Wie in Abb.14 dargestellt, ähneln sich die Wirkungen der Zweierkombinationen in allen Dosisbereichen von Bortezomib. Im Vergleich mit der Einzelbehandlung von Bortezomib handelt es sich aber nur um eine geringe, nicht synergistische Zunahme der Wirkung. Ferner kann durch die Dreierkombination im Vergleich mit den Zweierkombinationen keine wesentliche Verstärkung des zytostatischen Effekts erzielt werden.

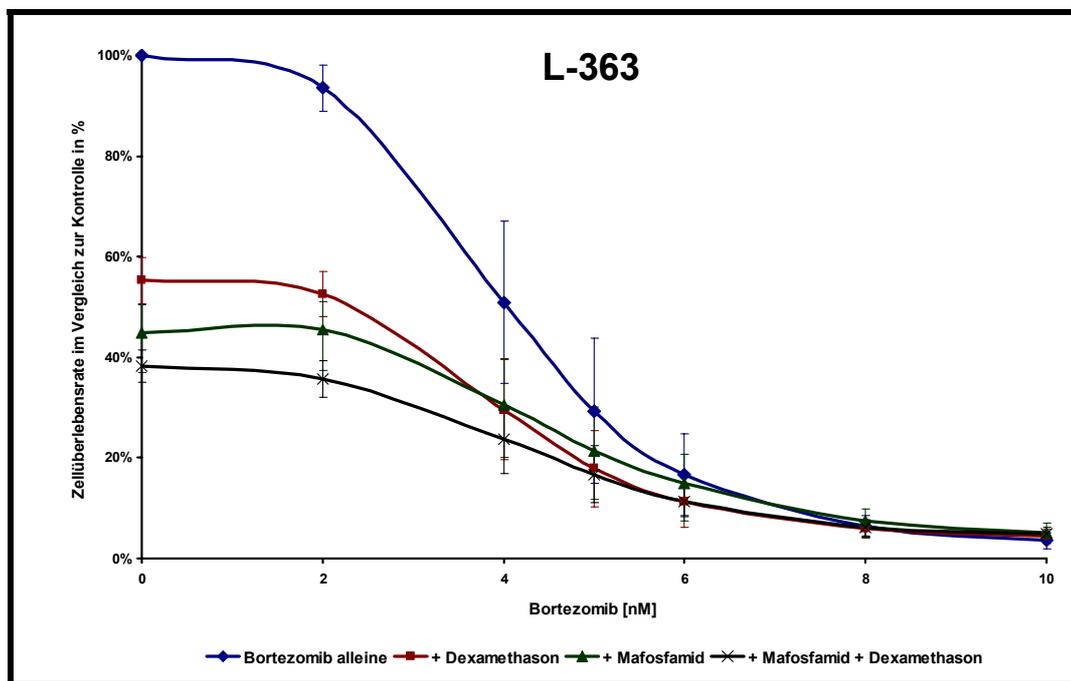


Abb.14: Behandlung der Zelllinie L-363 mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Bortezomib in Kombination mit den IC50 von Mafosfamid und Dexamethason

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen der dosisabhängigen Zellüberlebensraten in %, wobei eine aufsteigende Konzentrationsreihe von Bortezomib und die Kombinationsbehandlungen mit den IC50 von Mafosfamid und/oder Dexamethason verglichen werden. Es zeigt sich durch die Kombinationsbehandlungen nur ein geringer zusätzlicher Effekt. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch bestimmt. (Mafosfamid=3,8 µM, Dexamethason=0,06 µM)

4.4.2 Kombinationsbehandlung mit den IC50

Im Gegensatz zu Kapitel 4.4.1 wurde die Kombinationsbehandlung der Zelllinie L-363 im folgenden Versuch nicht mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe, sondern mit der IC50 von Bortezomib durchgeführt. Verglichen werden die Einzel- mit den Kombinationsbehandlungen. Das adjustierte Signifikanzniveau für multiples Testen liegt bei $p=0,0055$, da das ursprüngliche Signifikanzniveau von $p=0,05$ durch die Anzahl der durchgeführten Vergleiche ($n=9$) geteilt wurde (siehe auch Kapitel 3.2.6). Bei den Daten in Abb.15 und Abb.16, in denen die Ergebnisse der Signifikanzniveauberechnungen dargestellt sind, handelt es sich um die Daten eines Versuchs.

4.4.2.1 Kombination von Bortezomib mit Mafosfamid

Im Vergleich der Einzelbehandlung von Bortezomib mit der Zweierkombination aus Bortezomib mit Mafosfamid besteht eine signifikante ($p<0,0001$), aber geringe Abnahme der Zellüberlebensrate. Ferner besteht zwar im Vergleich der Einzelbehandlung von Bortezomib mit der Dreierkombination eine signifikante ($p=0,001$) Abnahme der Zellüberlebensrate, die Zellüberlebensrate der Dreierkombination unterscheidet sich jedoch nicht signifikant ($p=0,319$) von der Zweierkombination (siehe Abb.15).

4.4.2.2 Kombination von Bortezomib mit Dexamethason

Die Zellüberlebensrate der Zweierkombination von Bortezomib mit Dexamethason unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0,6123$) von der Einzelbehandlung mit Bortezomib. Grund hierfür könnte die hohe Zellüberlebensrate der Einzelbehandlung von Dexamethason sein. Sie liegt höher als die für diesen Versuch anvisierte 50%ige Zellüberlebensrate. Vergleicht man die Zweierkombination mit der Dreierkombination, dann lässt sich eine signifikante ($p=0,0025$) Minderung der Zellüberlebensrate feststellen. Insgesamt handelt es sich aber um einen geringen zusätzlichen zytostatischen Effekt (siehe Abb.15).

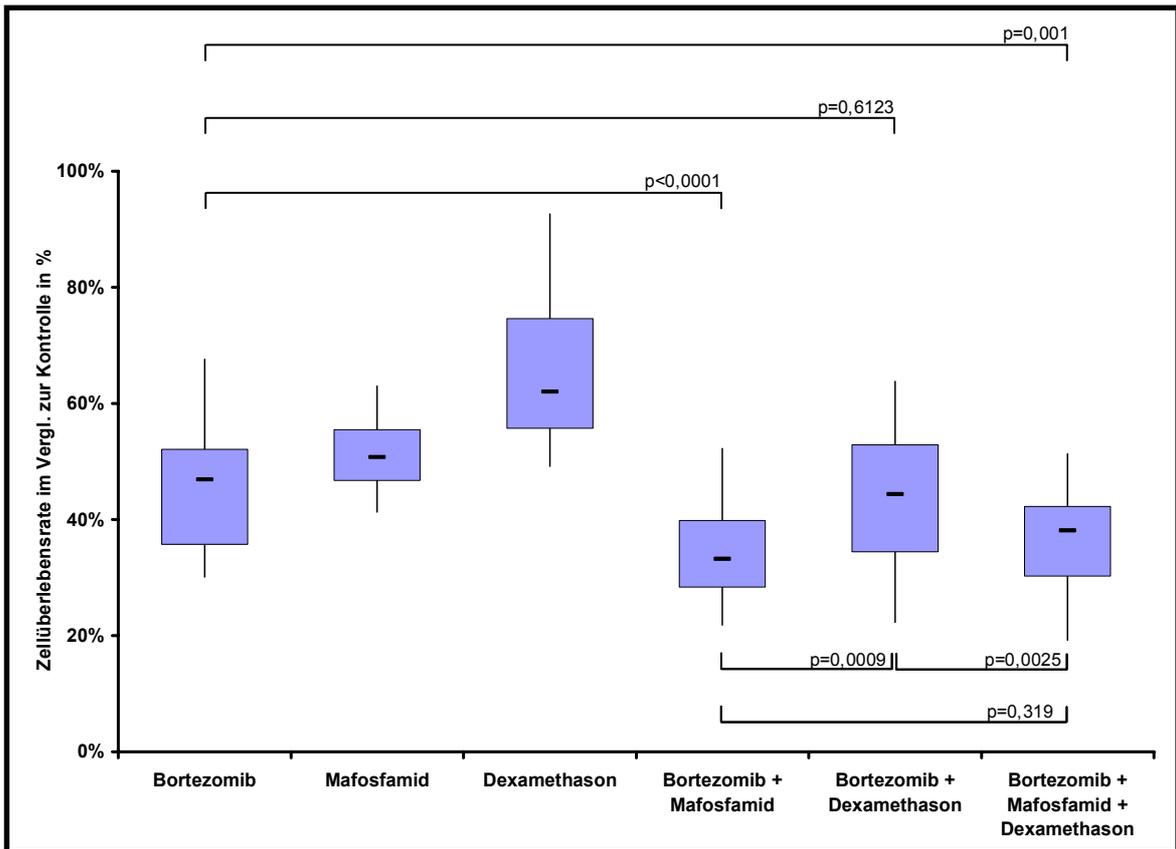


Abb.15: Behandlung der Zelllinie L-363 mit den IC50 von Bortezomib, Mafosfamid und Dexamethason einzeln und in Kombination

Anhand eines Boxplots sind die Zellüberlebensraten in % der Einzelbehandlungen von Bortezomib, Mafosfamid und Dexamethason im Vergleich mit den Zweier- und Dreierkombinationen dargestellt. Durch die Kombinationsbehandlungen zeigt sich nur eine geringe zusätzliche Minderung der Zellüberlebensrate. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch bestimmt. Der Boxplot stellt den Median ($n=36$) mit Interquantilabstand zwischen der 75% und 25% Quantile dar. Die obere und untere Antenne schließen 95% der Ergebnisse ein. Das adjustierte Signifikanzniveau für multiples Testen liegt bei $p=0,0055$. (Bortezomib=4,8 nM, Mafosfamid=3,8 μM , Dexamethason=0,06 μM)

4.4.2.3 Zeitlich versetzte Kombinationsbehandlung

Exemplarisch wurde an L-363 untersucht, ob die zeitversetzte Gabe von Bortezomib und Mafosfamid einen Unterschied in der Wirkung der Kombinationsbehandlung erzielt. Hierfür wurden die Zellen nach der Behandlung mit dem einen Kombinationspartner für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, bevor die Behandlung mit dem anderen Kombinationspartner erfolgte. In Abb.16 werden die simultane und die zeitversetzte Behandlung mit Bortezomib und Mafosfamid vergleichend dargestellt. Es besteht weder ein signifikanter Unterschied zwischen der simultanen Behandlung und den zeitversetzten Behandlungen ($p=0,1299$ und $p=0,3356$), noch zwischen den zeitversetzten Behandlungen untereinander ($p=0,897$).

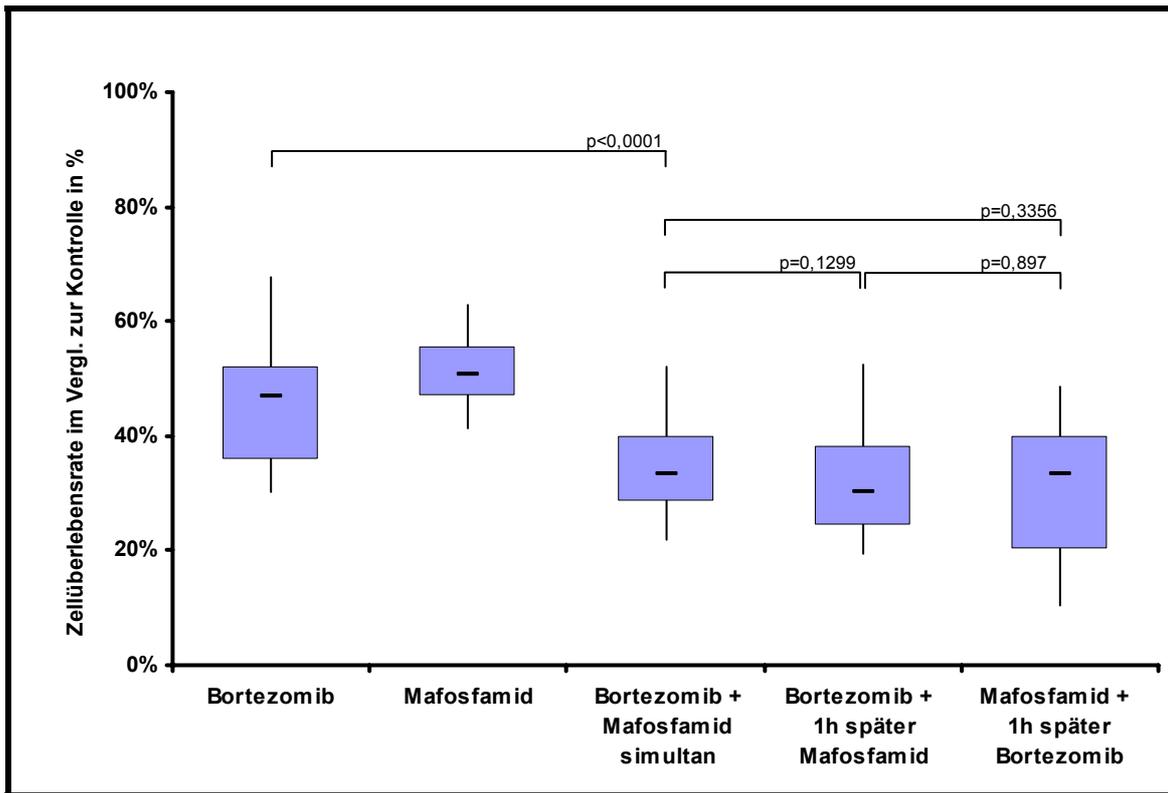


Abb.16: Behandlung der Zelllinien L-363 mit den IC50 der Kombination aus Bortezomib und Mafosfamid jeweils um eine Stunde zeitversetzt

Anhand eines Boxplots sind die Zellüberlebensraten in % der Einzelbehandlung von Bortezomib und Mafosfamid mit der simultanen und um eine Stunde zeitversetzten Kombinationsbehandlung von Bortezomib mit Mafosfamid vergleichend dargestellt. Zwischen der simultanen und den zeitversetzten sowie zwischen den zeitversetzten Kombinationsbehandlungen untereinander besteht kein signifikanter Unterschied. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch bestimmt. Der Boxplot stellt den Median (n=36) mit Interquantilabstand zwischen der 75% und 25% Quantile dar. Die obere und untere Antenne schließen 95% der Ergebnisse ein. Das adjustierte Signifikanzniveau für multiples Testen liegt bei $p=0,0055$. (Bortezomib=4,8 nM, Mafosfamid=3,8 μ M)

4.4.2.4 Kombinationsbehandlung und Dexamethason-Resistenz

Da sich OPM-2 resistent gegenüber Dexamethason gezeigt hat (siehe Abb.11), wurde die Wirkung von Bortezomib in Kombination mit Dexamethason untersucht und geprüft, ob Bortezomib diese Resistenz durchbrechen kann. Die Zellen wurden mit den IC50 von Bortezomib und Mafosfamid sowie mit Dexamethason (1 mM) behandelt. Es wurden die Einzelbehandlungen, die Kombination aus Bortezomib mit Dexamethason und die Dreierkombination verwendet. Das adjustierte Signifikanzniveau für multiples Testen (n=5) liegt bei $p=0,01$ (siehe Kapitel 3.2.6).

Wie in Abb.17 dargestellt, kann durch die Kombination von Dexamethason mit Bortezomib die Zellüberlebensrate im Vergleich mit der Einzelbehandlung von Dexamethason zwar signifikant ($p<0,0001$) gesenkt werden, der proliferationsfördernde Effekt von Dexametha-

son wird jedoch nicht vollständig aufgehoben. Ferner wird durch die Dreierkombination im Vergleich mit der Zweierkombination die Zellüberlebensrate signifikant ($p < 0,0001$) gesenkt, jedoch besteht zwischen der Zellüberlebensrate der Dreierkombination und der Einzelbehandlung mit Bortezomib kein signifikanter ($p = 0,0221$) Unterschied. Es sollte hierbei berücksichtigt werden, dass die Zellüberlebensrate der Einzelbehandlung von Mafosfamid oberhalb der antizipierten 50% liegt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Kombination mit Bortezomib die Resistenz von OPM-2 gegenüber Dexamethason in vitro nicht durchbrochen werden konnte.

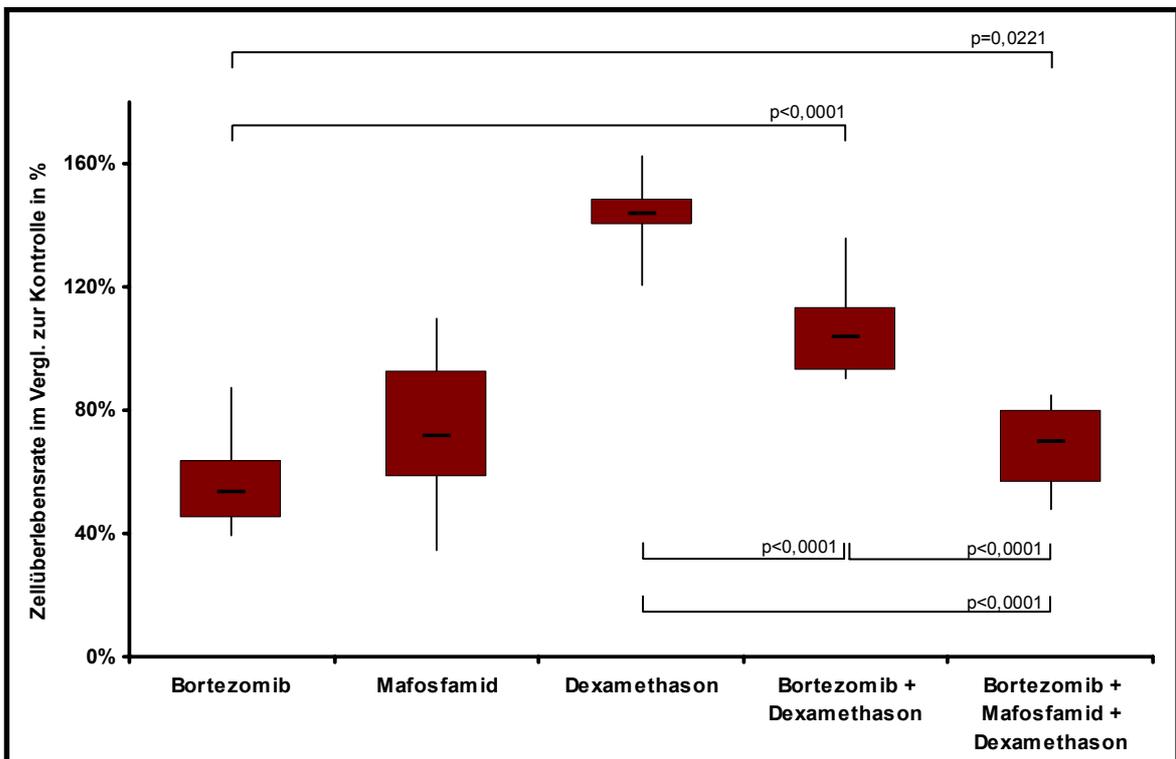


Abb.17: Behandlung der Zelllinie OPM-2 mit den IC50 von Bortezomib und Mafosfamid sowie mit 1 mM Dexamethason einzeln und in Kombination

Anhand eines Boxplots sind die Zellüberlebensraten in % der Einzelbehandlung von Bortezomib, Mafosfamid und Dexamethason im Vergleich mit der Zweierkombination von Bortezomib mit Dexamethason und der Dreierkombination dargestellt. Durch eine Kombination mit Bortezomib kann die Resistenz von OPM-2 gegenüber Dexamethason nicht durchbrochen werden. Die Zellüberlebensrate wurde photometrisch bestimmt. Der Boxplot stellt den Median ($n=21$) mit Interquantiabstand zwischen der 75% und 25% Quantile dar. Die obere und untere Antenne schließen 95% der Ergebnisse ein. Das adjustierte Signifikanzniveau für multiples Testen liegt bei $p=0,01$. (Bortezomib=4,8 nM, Mafosfamid=7,1 μ M, Dexamethason=1 mM)

4.4.3 „Combination Index“

Nach der Methode von Chou und Talalay, mit der eine quantitative Beschreibung der Kombinationsbehandlung möglich ist, wurde der „Combination Index“ (CI) berechnet (siehe Kapitel 3.2.5). Es handelt sich um eine anerkannte Methode in der Bewertung von Kombinationstherapien (Chauhan et al., 2005; Choi et al., 2005; David et al., 2005).

Wie in Abb.18 dargestellt, wurden die Zweierkombinationsbehandlungen der Zelllinie L-363 untersucht (siehe auch Abb.15). Für beide Kombinationsbehandlungen ergibt sich ein $CI > 1$, wobei die Kombinationsbehandlung von Bortezomib mit Mafosfamid einen $CI = 1,43$ und die Kombinationsbehandlung von Bortezomib mit Dexamethason einen $CI = 1,3$ aufweist. Anschaulich kann hiermit verdeutlicht werden, dass sich mit den beiden untersuchten Kombinationsbehandlungen in vitro keine synergistische Wirkung erzielen lässt. Es handelt sich jeweils um eine moderate antagonistische Wirkung, d.h. eine Wirkung, die geringer ausfällt, als die zu erwartende additive Wirkung dieser Kombination (Chou, 2006).

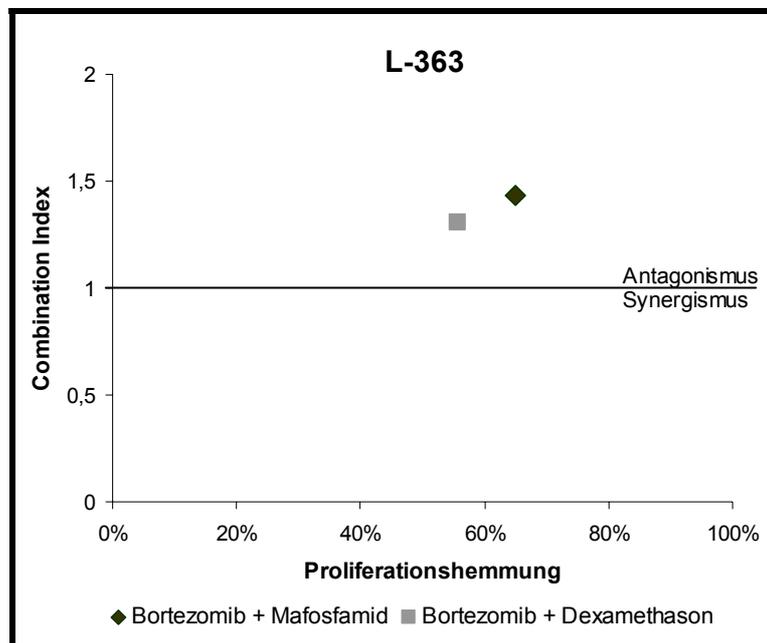


Abb.18: „Combination Index“

Dargestellt ist die Analyse der Kombinationsbehandlungen der Zelllinie L-363 mit den IC_{50} von Bortezomib und Mafosfamid oder Dexamethason. Beide Kombinationsbehandlungen erzielen eine moderate antagonistische Wirkung. Der „Combination Index“ ($CI > 1$: antagonistische Wirkung, $CI = 1$: additive Wirkung, $CI < 1$: synergistische Wirkung) wird mit der durch die Kombination erreichte Proliferationshemmung in Beziehung gesetzt. (Bortezomib=4,8 nM, Mafosfamid=3,8 μ M, Dexamethason=0,06 μ M)

5 Diskussion

5.1 Hintergrund

Hintergrund dieser Studie ist, dass ausreichend präklinische Untersuchungen hinsichtlich der Wirksamkeit der Kombination von Bortezomib mit Cyclophosphamid und Dexamethason in der Behandlung des multiplen Myeloms fehlen. Trotz dieses Defizits erfolgten bereits erste klinische Studien mit Bortezomib gestützten Kombinationstherapien, die Dexamethason und/oder Cyclophosphamid enthielten (Jagannath et al., 2006; Davies et al., 2007; Ozaki et al., 2007; Srikanth et al., 2008). Dies erfolgte ohne vorherige präklinische Klärung der Kombinationsfähigkeit von Bortezomib mit Cyclophosphamid und Dexamethason. Grund für diese frühzeitige klinische Anwendung ist zum einen eine konsequent pragmatische Etablierung neuer Therapiestrategien. Zum anderen hat sich Bortezomib, wie in der Einleitung beschrieben, besonders erfolgreich in der Therapie des multiplen Myeloms gezeigt. Rechtlich möglich wird die klinische Anwendung dieser Kombination ohne vorherige präklinische Abklärung durch die Gesetzgebung. Vor der klinischen Anwendung eines neuen Zytostatikums am Menschen sind präklinische in vitro Studien und Tierversuche vorgeschrieben. Laut § 40 Abs. 1 Nr. 6 Arzneimittelgesetz (AMG) darf

„die klinische Prüfung eines Arzneimittels ... bei Menschen nur durchgeführt werden, wenn und solange eine dem jeweiligen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse entsprechende pharmakologisch-toxikologische Prüfung des Arzneimittels durchgeführt worden ist.“ [Auslassungen durch den Verfasser]

Diese pharmakologisch-toxikologische Prüfung für Zytostatika beinhaltet präklinische in vitro und in vivo Studien zur Ermittlung von Wirksamkeit und Toxizität. Von besonderem Interesse sind hierbei die pharmakologische und toxikologische Prüfung der Substanz im Tierversuch. Anhand der Ergebnisse von in vitro Untersuchungen können zudem erste Einschätzungen über die Wirksamkeit sowie die Wirk- und mögliche Resistenzmechanismen eines Zytostatikums getroffen werden (EMA, 1998). Nach Zulassung eines Zytostatikums zur Monotherapie können, ohne präklinische Validierung der Effektivität, Kombinationsmöglichkeiten mit diesem Zytostatikum in klinischen Studien durchgeführt werden. Dies geschieht vor dem Hintergrund, dass konventionelle Zytostatika schon seit langer Zeit kombiniert werden, um eine effektivere Therapie zu erzielen. Prinzipiell ist dies ein rational anerkanntes Verfahren (EMA, 2005). Geklärt werden muss, ob dies auch für Zytostatika wie Bortezomib, die zur Gruppe der „molecularly targeted therapy“ gezählt werden, zutreffen sollte (Jackmann, 2004).

5.2 Kombination mit Bortezomib

5.2.1 In vitro Studien

Wie in der Einleitung besprochen, konnten Hideshima et al. die proliferationshemmende Wirkung von Bortezomib in vitro an verschiedenen multiple Myelomzelllinien demonstrieren, wobei auch die Kombination mit Dexamethason geprüft wurde. Wiederholt zeigte sich in der Kombination von Bortezomib mit Dexamethason ein additiver, d.h. kein synergistischer Effekt (Hideshima et al., 2001; Mitsiades et al., 2003). Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zelllinie L-363, die Dexamethason sensibel ist, konnte gleichfalls kein synergistischer Effekt, sondern nur eine mäßige Wirkverstärkung beobachtet werden (siehe Abb.14, 15 und 18). Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie OPM-2 eine Resistenz gegenüber Dexamethason, die durch die Kombination mit Bortezomib allein oder in der Dreierkombination mit Mafosfamid nicht aufgehoben werden konnte (siehe Abb.17). Von Interesse sind diese Ergebnisse im Hinblick auf die in der klinischen Praxis häufig auftretende Resistenzbildung gegenüber Dexamethason, die zu einem Rezidiv führen kann (Chauhan et al., 2002). Für die Entstehung einer Resistenz gibt es auf molekularer Ebene eine Vielzahl möglicher Ursachen. Grundsätzlich kann zwischen zwei Ebenen unterschieden werden, in denen Veränderungen zu einer Resistenz der Zelle führen können. Es handelt sich zum einen um Veränderungen, die direkt mit dem Glukokortikoid-Rezeptor in Verbindung stehen, und zum anderen um dem Glukokortikoid-Rezeptor nachgeschaltete Signalwege und Gene (Schmidt et al., 2004). Eine Hypothese besteht darin, dass eine alternative Splice-Variante des Glukokortikoid-Rezeptor-Gens ursächlich an der Entstehung einer Resistenz multipler Myelomzellen gegenüber Dexamethason verantwortlich ist (Moalli et al., 1993; Krett et al., 1995). Ferner konnten anhand von DNA-Mikroarray Untersuchungen 46 Gene identifiziert werden, deren Expression sich in der Behandlung von Zellen unterscheiden, die sensibel oder resistent gegenüber Dexamethason sind (Chauhan et al., 2002). Durch die Behandlung mit Dexamethason könnten also jene Gene, die für eine proapoptotische Wirkung notwendig waren, inaktiviert werden und sogar andere, die sich proliferativ auswirken, aktiviert werden.

Ein anderer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die in vitro Kombination von Bortezomib mit dem alkylierenden Zytostatikum Mafosfamid. Dies geschieht in Anlehnung an klinische Studien, welche die Kombination von Bortezomib mit Cyclophosphamid untersuchten (Davies et al., 2007; Kropff et al., 2007). Hervorzuheben sind hier die Schwierigkeiten bei der Verwendung von Cyclophosphamid in einer in vitro durchgeführten Versuchsanordnung. Sie könnte mitunter einen Grund für die geringe Datenlage präklinischer

in vitro Studien darstellen, die sich mit der Kombination von Bortezomib und Cyclophosphamid auseinandersetzen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist Cyclophosphamid ein Prodrug und muss vor Entfaltung seiner zytotoxischen Wirkung enzymatisch aktiviert werden. Durch die Verwendung von Mafosfamid, das spontan in den aktiven Metaboliten von Cyclophosphamid zerfällt, konnte der Schritt der enzymatischen Aktivierung umgangen und somit ein Cyclophosphamid Analogon direkt in vitro verwendet werden. Die Ergebnisse der Kombination von Bortezomib mit Mafosfamid - wie sie in Abb.14, 15 und 18 dargestellt sind - zeigen in vitro keine ausgeprägte Wirkungssteigerung. Zusätzlich konnte in der zeitlich versetzten Gabe keine Veränderung der Wirkung beobachtet werden (siehe Abb.16). Diese Daten stehen im Gegensatz zu bisherigen Studien, die die Kombination von Bortezomib mit alkylierenden Substanzen in vitro an multiplen Myelomzellen untersuchten. Mitsiades et al. und Baumann et al. untersuchten Bortezomib in Kombination mit Melphalan. Melphalan gehört zur Gruppe der Alkylantien und ist - wie in der Einleitung erwähnt - klassischerweise Bestandteil von Kombinationstherapien des multiplen Myeloms. Obwohl sowohl Mafosfamid als auch Melphalan eine alkylierende Wirkung haben, wirkt sich ihre Kombination mit Bortezomib unterschiedlich aus. In vitro zeigte sich unter Behandlung mit Bortezomib eine Sensibilisierung der Myelomzellen gegenüber der proliferationshemmenden Wirkung von Melphalan (Mitsiades et al., 2003; Baumann et al., 2008).

Sowohl die allgemein schwache Wirkungsverstärkung durch die Kombination mit Dexamethason und/oder Mafosfamid, als auch die Diskrepanz mit den Ergebnissen der Kombinationsbehandlung mit Melphalan, könnten in der in vitro Versuchsanordnung anhand bisher ungeklärter intrazellulärer Wirkungen von Bortezomib begründet liegen. Es kann beispielsweise spekuliert werden, dass sich Bortezomib auf die Funktionsweise des zellulären DNA-Reparatursystems auswirken könnte (Richardson und Siemann, 1995; Cai et al., 2000). Es wäre möglich, dass hierdurch die durch Mafosfamid oder Melphalan entstandenen spezifischen DNA-Schäden unterschiedlich verarbeitet werden. Die Folge wäre eine veränderte Aktivierung proapoptotischer Signalwege, wie z.B. p53 abhängiger Signalwege, und ggf. eine verlängerte Überlebenszeit der Tumorzelle (Lane, 1992). Ferner ist es möglich, dass Bortezomib einen Einfluss auf spezifische zelluläre Transportsysteme hat, die intrazelluläre Zytostatikakonzentrationen beeinflussen können. Über eine Induktion oder Veränderung der Funktionsweise dieser Transporter könnte die Wirkung der Zytostatika beeinflusst werden (Dalton et al., 1989; Sonneveld et al., 1994). Für die Klärung solcher Fragestellungen sind weitere präklinische in vitro Studien notwendig, die sich mit den molekularen Vorgängen befassen, die sich während der Kombination von Bortezomib

mit anderen Chemotherapeutika abspielen. Es sollte bei der Verwendung von Bortezomib bedacht werden, dass es sich um ein neuartiges Medikament handelt, dessen spezifische molekularen Wirkmechanismen nicht abschließend geklärt sind.

5.2.2 Klinische Studien

Zusammenfassend betrachtet, zeigt sich Bortezomib innerhalb bisheriger klinischer Studien als geeigneter Kombinationspartner. Es konnte in Kombination mit anderen Zytostatika ohne große Zunahme des Nebenwirkungsprofils eine höhere Ansprechrate erzielt werden (Richardson et al., 2006). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kombination liegen Ergebnisse aus klinischen Studien vor, die zum einen die Kombination von Bortezomib mit Dexamethason und zum anderen die Dreierkombination von Bortezomib mit Cyclophosphamid und Dexamethason untersuchten (Richardson et al., 2003; Jagannath et al., 2004; Kropff et al., 2005; Jagannath et al., 2006; Davies et al., 2007; Kropff et al., 2007; Ozaki et al., 2007). Bei der Betrachtung dieser Daten sollte berücksichtigt werden, dass jeweils nur eine geringe Anzahl (n=14 bis 74) Patienten in die Studien eingeschlossen wurden. Es stellt sich somit die Frage der Validität dieser Daten.

Für die Zweierkombination von Bortezomib mit Dexamethason liegen Ergebnisse aus zwei - bereits in der Einleitung erwähnten Studien - vor, bei denen sich durch die nachträgliche Kombination mit Dexamethason ein verbessertes Ansprechen (18% (n=74) und 33% (n=27)) zeigte, wenn zuvor kein ausreichender Therapieerfolg in der Monotherapie mit Bortezomib zu verzeichnen war. Hierunter fielen auch Patienten, die zuvor nicht auf Dexamethason angesprochen hatten, d.h. bei denen eine Dexamethason-Resistenz bestand (Jagannath et al., 2006). Ferner konnte in einer anderen Studie durch die Kombination von Bortezomib mit Dexamethason eine relative hohe Ansprechrate von 64% (n=14) erreicht werden (Ozaki et al., 2007). Zum Vergleich sei hier nochmals die bereits in der Einleitung erwähnte Ansprechrate von 35% (n=202) und 38% (n=54) für die Monotherapie mit Bortezomib erwähnt (Richardson et al., 2003; Jagannath et al., 2004). Wie in Abb.15 und Abb.17 zu sehen, konnte in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu den Ergebnissen der klinischen Studien, weder eine vorhandene Resistenz gegenüber Dexamethason durchbrochen werden, noch erwies sich die Kombination mit Dexamethason als besonders vorteilhaft.

Die oben beschriebenen Abweichungen der in vitro Ergebnisse von den Ergebnissen klinischer Studien finden sich auch in einer Studie wieder, die ein Therapieregimen aus Bortezomib in Kombination mit Dexamethason und niedrig dosiertem, oral verabreichtem

Cyclophosphamid prüfte. Hier lag die Ansprechrate bei 90% (n=54) mit einer 16%igen Komplettremissionsrate (Kropff et al., 2007). Eine andere Studie verglich das Ansprechen von 47 Patienten, von denen 11 Patienten nur Bortezomib, 20 Patienten Bortezomib in Kombination mit Dexamethason und 16 Patienten die Dreierkombination aus Bortezomib mit Dexamethason und Cyclophosphamid erhielten. Die Ansprechrate lag bei 27% für Bortezomib allein, bei 47% für die Zweierkombination aus Bortezomib mit Dexamethason und bei 75% in Behandlung mit der Dreierkombination. Erstaunlich hoch erwies sich die Komplettremissionrate für die Dreierkombination mit 31% im Vergleich zu nur 5% der Zweierkombination, wohingegen die Monotherapie mit Bortezomib keine einzige komplette Remission erzielte (Davies et al., 2007). Insgesamt zeigt sich also innerhalb dieser klinischen Studien ein Vorteil der Kombination von Bortezomib mit Dexamethason und Cyclophosphamid, den wir in vitro nicht bestätigen können (siehe Abb.14 bis 18). Mögliche Gründe für diese Abweichung werden im folgenden Kapitel erläutert.

5.2.3 Limitierung der in vitro Untersuchung

Wie in den Abb.14 bis 18 zu sehen ist, konnte durch die Kombinationsbehandlung in vitro kein explizierter Vorteil im Vergleich mit der Monotherapie von Bortezomib erzielt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Überlegenheit der Kombination innerhalb klinischer Studien. Die geringe zusätzliche proliferationshemmende Wirkung der Kombination in vitro könnte damit zu erklären sein, dass in der verwendeten Versuchsanordnung die Interaktion von Myelomzellen mit dem Knochenmarkstroma nicht repräsentiert wurde. In der vorliegenden Arbeit sind multiple Myelomzellen in vitro kultiviert und behandelt worden. Was den Zellen somit fehlt, ist ihre natürliche Umgebung, das Knochenmark. Die Wirkung der Zytostatika richtet sich jedoch zum einen direkt auf die Tumorzelle, zum anderen auf die Interaktion der Tumorzelle mit dem umgebenden Stroma und der damit verbundenen Angiogenese. In der verwendeten Versuchsanordnung wurde die Minderung der Zellüberlebensrate ermittelt, die - wie in Abb.13 zu sehen ist - einer spezifischen proapoptotischen Wirkung der Zytostatika zuzuordnen ist. Untersucht wurde die direkte Wirkung auf die Zellen. Speziell Bortezomib beeinflusst jedoch sowohl die Myelomzelle selbst, also auch deren reziproke Interaktion mit dem Knochenmarkstroma. Erst die Verbindung der direkten und indirekten Wirkung der Kombinationsbehandlung könnte für den klinischen Vorteil verantwortlich sein.

Eine Schwierigkeit, multiple Myelomzelllinien zu etablieren und in vitro zu kultivieren, besteht in ihrer Abhängigkeit zum Knochenmarkstroma. Ohne den Kontakt zum Knochenmarkstroma ist eine Kultivierung oft nicht möglich. Die meisten etablierten Zelllinien proli-

ferieren jedoch unabhängig vom Knochenmarkstroma und stellen so eine Sonderform dar (Dimberg, 2006). Beide in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien L-363 und OPM-2, die - wie in Abb.8 zu sehen - ein vergleichbares Wachstumsverhalten haben, stammen ursprünglich aus dem Blut von Patienten, die an einem multiplen Myelom in leukämischer Phase erkrankt waren (Diehl et al., 1978; Gomi et al., 1990). In diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ist es möglich, dass sich die Zellen durch Mutationen und chromosomale Abberation stark verändert haben (Mitsiades et al., 2007). Hier stellt sich die Frage, inwieweit sich die Überlebensstrategien der *in vitro* verwendeten Zelllinien den Myelomzellen im erkrankten Patienten gleichen. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass die Pathogenese des multiplen Myeloms eng an die Interaktion der Plasmazellklone mit dem im Knochenmark vorhandenen Mikromilieu gekoppelt ist (Mitsiades et al., 2004; Caers et al., 2008a). Die Knochenmarksumgebung besteht aus der extrazellulären Matrix und den stromalen Knochenmarkszellen (Mitsiades et al., 2007). Die reziproke Interaktion über multiple Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle führt zu einer parakrinen und autokrinen Sekretion unterschiedlicher Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. IL-1, IL-6, IGF, HGF, VEGF, SDF-1 und TNF- α). Diese Botenstoffe wirken sich sowohl auf die Tumorzellen, als auch auf das Knochenmarksmilieu aus (Mitsiades et al., 2004; Mitsiades et al., 2007; Anargyrou et al., 2008). Zum einen stören Myelomzellen die Hämostase von Knochenbildung und Knochenabbau, wodurch es zu osteolytischen Läsionen kommen kann (Ashcroft et al., 2003). Zum andern fördert die Bindung von Myelomzellen an stromale Knochenmarkszellen ihre Proliferation und schützt sie vor der Wirkung der Zytostatika (Damiano et al., 1999; Hideshima et al., 2002; Mitsiades et al., 2006).

Zusammengefasst besteht zwischen multiplen Myelomzellen und dem Knochenmarkstroma *in vivo*, d.h. *in natura*, eine Wechselbeziehung über Adhäsionsmoleküle und Zytokine, die entscheidend den Progress der Erkrankung beeinflusst. Diese Wechselbeziehung ist in der *in vitro* Versuchsanordnung nicht widergespiegelt. Gerade Bortezomib beeinflusst aber die Interaktion der Myelomzellen mit dem Knochenmark. Der dafür mitentscheidende molekulare Wirkungsmechanismus von Bortezomib ist die Inhibition von Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B), einem Transkriptionsfaktor mit unterschiedlichen Einflüssen auf den Zellzyklus (Karin und Ben-Neriah, 2000). Geregelt wird die Aktivität von NF- κ B über die Bindung an einen spezifischen Inhibitor, Inhibitor of kappa B (I κ B). Durch Bindung mit I κ B wird NF- κ B normalerweise inaktiviert (Beg und Baldwin, 1993). Phosphorylierung, Ubiquinierung und proteolytische Degradation von I κ B sind nötig, um NF- κ B zu aktivieren. Dies führt nach Translokation in den Zellkern zur Förderung der Transkription

verschiedener spezifischer Gene (Zandi und Karin, 1999). Bortezomib blockiert indirekt die Aktivierung von NF- κ B durch Inhibierung der proteasomalen Degradierung von I κ B (siehe Abb.19).

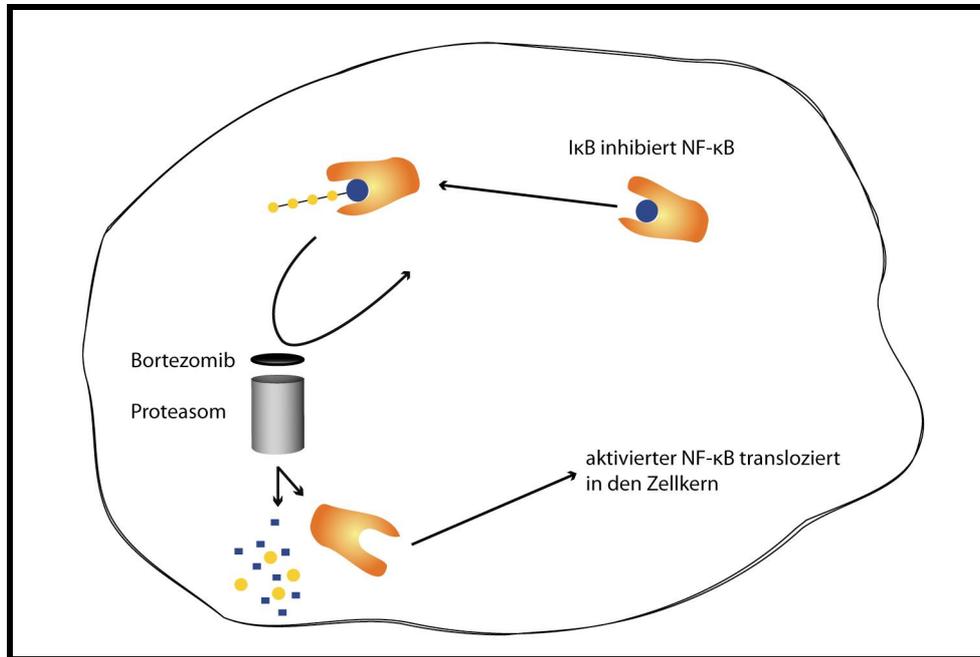


Abb. 19: Bortezomib inhibiert NF- κ B

Für die Aktivierung von NF- κ B (orange) ist die proteasomale Degradation von I κ B (blau) nötig, die durch Bortezomib verhindert wird (modifiziert nach http://journals.prous.com/journals/dof/20022711/html/df271079/images/Bortezomib_f2.jpg. Stand: 07.11.08).

Wie bereits erläutert, fördert die Adhäsion von Myelomzellen an stromale Knochenmarkzellen die Sekretion verschiedener Zytokine, insbesondere von Interleukin-6 (IL-6), das einen der bedeutendsten Wachstumsfaktoren multipler Myelomzellen darstellt. (Kawano *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1990; Cheung und Van Ness, 2001; Hideshima *et al.*, 2002). Außerdem entsteht durch die Adhäsion ein sich selbst verstärkender Kreislauf zwischen der parakrinen Sekretion der stromalen Knochenmarkzellen und der autokrinen Sekretion multipler Myelomzellen (Caligaris-Cappio *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1996). NF- κ B spielt bei dieser Interaktion auf molekularer Ebene eine zentrale Rolle, da sich nach Adhäsion der Myelomzellen an stromale Knochenmarkzellen über die Aktivierung von NF- κ B die Konzentration von IL-6 erhöht (Chauhan *et al.*, 1996). Bortezomib greift in diesen Mechanismus ein, indem es die Adhäsion der Myelomzellen an stromale Knochenmarkzellen hindert und so die Sekretion von IL-6 inhibiert (Hideshima *et al.*, 2001). Die spezifische Inhibition von NF- κ B führt zu einer Minderung der durch die Adhäsion geförderten Proliferation multipler Myelomzellen (Hideshima *et al.*, 2002). In Bezug auf die proliferationshemmende Wirkung könnte, zusätzlich zu der Konzentrationsabnahme von IL-6, das direkte

Eingreifen von Bortezomib in IL-6 abhängige proliferationsfördernde Signalkaskaden verantwortlich sein (Ogata et al., 1997; Hideshima et al., 2001; Orlowski et al., 2002a; Hideshima et al., 2003).

Die oben aufgeführten Aspekte legen den Schluss nahe, dass ein Anteil der Wirkungen von Bortezomib in vitro nicht repräsentiert ist. Bei diesem Anteil, der sich in den Ergebnissen der in vitro Versuche nicht wiederfindet, handelt es sich um den Einfluss von Bortezomib auf die reziproke Interaktion der Myelomzellen mit dem Knochenmark. Diese proliferationsfördernden Signale werden in den Untersuchungen der Zellüberlebensrate der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Insgesamt könnten hierdurch die quantitativen Wirkungen der Kombinationsbehandlungen gegenüber der klinischen Realität abgeschwächt werden. Ferner lässt sich durch die inhibitorische Wirkung von Bortezomib auf IL-6 in vivo erklären, weshalb sich in vitro eine Resistenz gegenüber Dexamethason nicht durchbrechen ließ, da nämlich IL-6 Myelomzellen vor der proapoptotischen Wirkung von Dexamethason schützen kann und diese schützende Funktion durch Bortezomib in vivo, aber nicht in vitro aufgehoben wird (Juge-Morineau *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1996).

Ein anderer Gesichtspunkt, der in vitro nicht repräsentiert und der für die Wirkung von Bortezomib entscheidend ist, besteht in der Beeinflussung der Tumorangiogenese. Angiogenese stellt die Neubildung von Blutgefäßen aus einem bereits existierenden Gefäßsystem dar (Risau, 1997). Neue Blutgefäße versorgen das Malignom mit Sauerstoff und Nährstoffen und dienen dem Abtransport von Kataboliten. Endotheliale Zellen unterstützen eine neoplastische Invasion und Metastasierung durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Proteinasen (Mignatti und Rifkin, 1993; Folkman, 1995). Beteiligt an der Angiogenese ist die direkte oder indirekte Wirkung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (Ribatti et al., 2006).

Obwohl die Tumorangiogenese seit langem anerkannter Bestandteil der Pathophysiologie solider Tumoren ist, hat sich dieses Konzept erst spät auf hämatologische Neoplasien übertragen lassen. 1994 beschrieben Vacca et al. eine Korrelation zwischen der Dichte der Mikrogefäße im Knochenmark und der Aktivität des multiplen Myeloms (Vacca et al., 1994). Hiernach führt die Zunahme der Dichte der Mikrogefäße im Knochenmark zu einem prognostischen Nachteil (Sezer et al., 2000).

Bortezomib verringert in der Behandlung des multiplen Myeloms die Anzahl neu gebildeter Gefäße, hemmt das Wachstum endothelialer Zellen und inhibiert die Sekretion von IL-6, das über einen parakrinen Rückkopplungsmechanismus an der Sekretion von Vascular endothelial growth factor (VEGF) beteiligt ist. VEGF ist ein Signalmolekül mit einer essentiellen regulatorischen Funktion der physiologischen und pathologischen Angiogenese. Zusätzlich zur Sprießung bereits existierender Gefäße (Angiogenese) kann VEGF durch Rekrutierung von hoch proliferativen endothelialen Vorläuferzellen die Formierung neuer Gefäße (Vaskulogenese) vorantreiben (Dankbar et al., 2000; Podar und Anderson, 2005; Roccaro et al., 2006). In präklinischen in vivo Studien konnte die antiangiogene Wirkung von Bortezomib am Tiermodell nachgewiesen und bestätigt werden (Dankbar et al., 2000; LeBlanc et al., 2002; Hamner et al., 2007). Neben dem weiter oben beschriebenen Anteil der Wirkungen von Bortezomib auf die Interaktion der Myelomzellen mit dem Knochenmark, stellt die Beeinflussung der Angiogenese einen weiteren Anteil dar, der in vitro nicht repräsentiert wurde und der Grund für die Abweichungen der Ergebnisse klinischer Studien mit den in vitro Daten der vorliegenden Arbeit sein könnte.

5.3 Ausblick

Mit der Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Onkologie, wie der „molecular targeted therapies“, zu denen auch Bortezomib zählt, besteht eine neue Herausforderung in der Kombination von „alt“ und „neu“. Die etablierten Therapieregime beinhalten Kombinationspartner mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, deren Interaktion mit den neuen „molecular targeted therapies“ schwer vorhersehbar ist (Jackmann, 2004). Es können sich agonistische sowie antagonistische Wirkungen einstellen, deren präklinische Evaluation berücksichtigt werden sollte, bevor es zur Anwendung am Menschen kommt. Die hierfür nötigen rechtlichen Maßnahmen müssten neu formuliert werden. Die Bedeutung präklinischer in vitro Versuche könnte darin bestehen, die Diskrepanzen zwischen der klinischen Wirklichkeit und ihrer Abbildung in vitro zu hinterfragen. Beispielsweise könnte in weiterführenden Studien die Wirkung von Bortezomib in Kombination mit anderen Zytostatika auf die Interaktion der Myelomzelle mit dem Knochenmarkstroma untersucht werden. Durch die gemeinsame Inkubation von Myelomzellen mit stromalen Knochenmarkzellen in der Zellkultur könnte so der proliferationshemmende Effekt einer Kombinationstherapie mit Bortezomib studiert werden (Cheung und Van Ness, 2001; Hideshima et al., 2001; Hideshima et al., 2002). Insbesondere könnten die molekularen Mechanismen weiter beleuchtet werden, die die besondere Wirkung von Bortezomib auf die Tumoriangiogenese ausmachen. Von besonderem Interesse sind hierbei die Wechselwirkungen, die durch die Kombination von Bortezomib mit anderen Zytostatika entstehen. In Bezug auf die Effekti-

vität einer Kombinationstherapie sollte in Anbetracht der für das multiple Myelom vorhandenen Limitierungen der *in vitro* Versuche die Bedeutung präklinischer *in vivo* Versuche unterstrichen werden. Aus diesem Grund sollten präklinische *in vivo* Studien vor der klinischen Anwendung am Menschen einen angemessenen Stellenwert erhalten, um die Wirkung einer Kombinationschemotherapie quantitativ und qualitativ zu bestimmen.

6 Zusammenfassung

Bortezomib ist ein neuartiges Zytostatikum aus der Klasse der Proteasomen-Inhibitoren, das in der Therapie des multiplen Myeloms genutzt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirksamkeit von Bortezomib in Kombination mit Mafosfamid und Dexamethason in vitro zu untersuchen. Sie beinhaltet die Fragestellung, ob die Kombination einen Vorteil gegenüber der Einzelbehandlung mit Bortezomib bietet. Hintergrund ist, dass diese Kombination, ohne vorher präklinisch evaluiert zu werden, bereits innerhalb klinischer Studien geprüft wurde.

Um die Wirkungen der Kombinationsbehandlungen vergleichen zu können, wurden die Zellüberlebensraten photometrisch mit dem WST-1 Assay bestimmt. Zusätzlich erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit dem Annexin V-FITC Apoptose-Assay. Verwendet wurden die multiplen Myelomzelllinien L-363 und OPM-2.

Sowohl L-363 als auch OPM-2 zeigten eine dosisabhängige Minderung der Zellüberlebensrate unter Behandlung mit Bortezomib und Mafosfamid, wobei die ermittelten Konzentrationsbereiche jeweils vergleichbar waren. Im Gegensatz zu L-362 erwies sich OPM-2 als resistent gegenüber der Behandlung mit Dexamethason. Durchflusszytometrisch konnte der photometrisch bestimmten Proliferationshemmung eine spezifische proapoptotische Wirkung der Zytostatika zugeordnet werden.

Für Bortezomib lagen die IC₅₀ hundertfach unterhalb, die für Mafosfamid und Dexamethason innerhalb therapeutischer Konzentrationsbereiche. Die IC₅₀ wurden für Kombinationsbehandlungen genutzt, in denen die Einzelbehandlungen mit den Zweier- und Dreierkombinationen verglichen wurden. Durch die Kombination von Bortezomib mit Mafosfamid und/oder Dexamethason konnte eine signifikante Abnahme der Zellüberlebensrate gegenüber der Einzelbehandlung mit Bortezomib erzielt werden. Die Wirkungsverstärkung durch die Kombination war jedoch nur gering ausgeprägt, ohne einen synergistischen Effekt aufzuweisen. Zwischen der simultanen und der um eine Stunde zeitversetzten Kombinationsbehandlung mit Bortezomib und Mafosfamid gab es hinsichtlich der Zellüberlebensrate keinen Unterschied. Ferner bewirkte die Dreierkombination im Vergleich mit den Zweierkombinationen nur eine geringe zusätzliche Minderung der Zellüberlebensrate. Letztlich konnte durch die Kombination mit Bortezomib die Resistenz von OPM-2 gegenüber Dexamethason nicht durchbrochen werden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kombination *in vitro* nur einen geringen Vorteil gegenüber der Einzelbehandlung darstellt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen bisheriger klinischer Studien, die diese Kombination untersuchten und einen Vorteil der Kombinationsbehandlung demonstrieren konnten. Die Ursache dieser Abweichung könnte darin begründet liegen, dass innerhalb der *in vitro* Versuchsanordnung die Interaktion der Myelomzellen mit dem Knochenmark nicht adäquat repräsentiert wurde.

Für ein besseres Verständnis von Bortezomib sollten weitere präklinische Studien durchgeführt werden, um die molekularen Mechanismen einer Kombinationsbehandlung mit Bortezomib nachhaltig zu klären. Hierbei könnten innerhalb einer *in vitro* Versuchsanordnung Myelomzellen gemeinsam mit Stromalen Knochenmarkzellen inkubiert und so der Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Knochenmark-Interaktion untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. **Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ:** Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59:2615-2622 (1999).
2. **Aisner J, Whitacre MY, Budman DR, Propert K, Strauss G, Van Echo DA, Perry M:** Cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide, and etoposide combination chemotherapy for small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 29:435-438 (1992).
3. **Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM, Trichopoulos D:** Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 120 Suppl 12:40-61 (2007).
4. **Alexanian R, Barlogie B, Dixon D:** High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med* 105:8-11 (1986).
5. **Anargyrou K, Dimopoulos MA, Sezer O, Terpos E:** Novel anti-myeloma agents and angiogenesis. *Leuk Lymphoma* 49:677-689 (2008).
6. **Anonymus:** Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol* 16:3832-3842 (1998).
7. **Anonymus:** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121:749-757 (2003).
8. **Ashcroft AJ, Davies FE, Morgan GJ:** Aetiology of bone disease and the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 4:284-292 (2003).
9. **Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, Monconduit M, Hulin C, Caillot D, Bouabdallah R, Voillat L, Sotto JJ, Grosbois B, Bataille R:** Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 349:2495-2502 (2003).
10. **Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R:** A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335:91-97 (1996).
11. **Barnes PJ:** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94:557-572 (1998).

12. **Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R:** Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leuk Res* 32:1144-1147 (2008).
13. **Beg AA, Baldwin AS, Jr.:** The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 7:2064-2070 (1993).
14. **Bergsagel DE, Sprague CC, Austin C, Griffith KM:** Evaluation of new chemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. IV. L-Phenylalanine mustard (NSC-8806). *Cancer Chemother Rep* 21:87-99 (1962).
15. **Berridge MV, Herst PM, Tan AS:** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127-152 (2005).
16. **Blade J, Samson D, Reece D, Apperley J, Bjorkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giral S, Jagannath S, Vesole D:** Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol* 102:1115-1123 (1998).
17. **Blaney SM, Balis FM, Berg S, Arndt CA, Heideman R, Geyer JR, Packer R, Adamson PC, Jaeckle K, Klenke R, Aikin A, Murphy R, McCully C, Poplack DG:** Intrathecal mafosfamide: a preclinical pharmacology and phase I trial. *J Clin Oncol* 23:1555-1563 (2005).
18. **Boccardo M, Morgan G, Cavenagh J:** Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* 5:18 (2005).
19. **Brock N:** Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 49:1-7 (1989).
20. **Brock N, Pohl J:** Prevention of urotoxic side effects by regional detoxification with increased selectivity of oxazaphosphorine cytostatics. *IARC Sci Publ* 269-279 (1986).
21. **Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Bradley S, Gobburu JV, Goheer A, Lee SL, Leighton J, Liang CY, Lostritto RT, McGuinn WD, Morse DE, Rahman A, Rosario LA, Verbois SL, Williams G, Wang YC, Pazdur R:** Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 10:3954-3964 (2004).
22. **Buttgereit F:** [Mechanism of action and effects of glucocorticoids]. *Z Rheumatol* 60:117-119 (2001).
23. **Buttgereit F, Scheffold A:** Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67:529-534 (2002).

24. **Caers J, Van Valckenborgh E, Menu E, Van Camp B, Vanderkerken K:** Unraveling the biology of multiple myeloma disease: cancer stem cells, acquired intracellular changes and interactions with the surrounding micro-environment. *Bull Cancer* 95:301-313 (2008a).
25. **Caers J, Vande Broek I, De Raeve H, Michaux L, Trullemans F, Schots R, Van Camp B, Vanderkerken K:** Multiple Myeloma, an update on diagnosis and treatment. *Eur J Haematol* (2008b).
26. **Cai Y, Wu MH, Xu-Welliver M, Pegg AE, Ludeman SM, Dolan ME:** Effect of O6-benzylguanine on alkylating agent-induced toxicity and mutagenicity. In Chinese hamster ovary cells expressing wild-type and mutant O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Cancer Res* 60:5464-5469 (2000).
27. **Caligaris-Cappio F, Bergui L, Gregoret MG, Gaidano G, Gaboli M, Schena M, Zallone AZ, Marchisio PC:** Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood* 77:2688-2693 (1991).
28. **Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, Hideshima T, Li G, Podar K, Gupta D, Richardson P, Schlossman RL, Krett N, Chen LB, Munshi NC, Anderson KC:** Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* 21:1346-1358 (2002).
29. **Chauhan D, Catley L, Li G, Podar K, Hideshima T, Velankar M, Mitsiades C, Mitsiades N, Yasui H, Letai A, Ovaa H, Berkers C, Nicholson B, Chao TH, Neuteboom ST, Richardson P, Palladino MA, Anderson KC:** A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* 8:407-419 (2005).
30. **Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC:** Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87:1104-1112 (1996).
31. **Chen YH, Desai P, Shiao RT, Lavelle D, Haleem A, Chen J:** Inhibition of myeloma cell growth by dexamethasone and all-trans retinoic acid: synergy through modulation of interleukin-6 autocrine loop at multiple sites. *Blood* 87:314-323 (1996).
32. **Chen YL, Liu YQ, Tang DH, Chu CN:** [Comparative study of different chemotherapy approaches for advanced epithelial ovarian cancer]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 43:110-114 (2008).
33. **Cheung WC, Van Ness B:** The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. *Leukemia* 15:264-271 (2001).

34. **Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ:** High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348:1875-1883 (2003).
35. **Choi W, Gerner EW, Ramdas L, Dupart J, Carew J, Proctor L, Huang P, Zhang W, Hamilton SR:** Combination of 5-fluorouracil and N1,N11-diethylnorspermine markedly activates spermidine/spermine N1-acetyltransferase expression, depletes polyamines, and synergistically induces apoptosis in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 280:3295-3304 (2005).
36. **Chou TC:** Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681 (2006).
37. **Colvin M, Padgett CA, Fenselau C:** A biologically active metabolite of cyclophosphamide. *Cancer Res* 33:915-918 (1973).
38. **Crook TR, Souhami RL, McLean AE:** Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer Res* 46:5029-5034 (1986).
39. **Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, Scheper RJ, Durie BG, Taylor CW, Miller TP, Salmon SE:** Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 7:415-424 (1989).
40. **Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS:** Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93:1658-1667 (1999).
41. **Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J:** Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95:2630-2636 (2000).
42. **David E, Sun SY, Waller EK, Chen J, Khuri FR, Lonial S:** The combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and the proteasome inhibitor bortezomib induces synergistic apoptosis in human myeloma cells that is associated with down-regulation of p-AKT. *Blood* 106:4322-4329 (2005).
43. **Davies FE, Wu P, Jenner M, Srikanth M, Saso R, Morgan GJ:** The combination of cyclophosphamide, velcade and dexamethasone induces high response rates with comparable toxicity to velcade alone and velcade plus dexamethasone. *Haematologica* 92:1149-1150 (2007).
44. **Diehl V, Schaadt M, Kirchner H, Hellriegel KP, Gudat F, Fonatsch C, Laskewitz E, Guggenheim R:** Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells

- and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. *Blut* 36:331-338 (1978).
45. **Dimberg L:** Apoptosis Regulation in Multiple Myeloma.
<http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-7099>. Stand: 12.01.09. (2006).
 46. **Durie BG, Salmon SE:** A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36:842-854 (1975).
 47. **EMEA:** Guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man (CPMP/EWP/205/95/Rev.3/Corr.2).
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/020595en.pdf>. Stand: 01.09.08. (2005).
 48. **EMEA:** Note for guidance on the pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products (CPMP/SWP/997/96).
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/099796en.pdf>. Stand: 01.09.08. (1998).
 49. **FDA:** Velcade (bortezomib) is Approved for Initial Treatment of Patients with Multiple Myeloma.
<http://www.fda.gov/CDER/Offices/OODP/whatsnew/bortezomib2008.htm>. Stand: 01.09.08. (2008).
 50. **Folkman J:** Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333:1757-1763 (1995).
 51. **Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K:** Glucocorticoide. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, S. 704-720, Urban und Fischer Verlag, München (2001).
 52. **Gaynon PS, Carrel AL:** Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol* 457:593-605 (1999).
 53. **Geley S, Fiegl M, Hartmann BL, Kofler R:** Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 128:1-97 (1996).
 54. **Gomi M, Moriwaki K, Katagiri S, Kurata Y, Thompson EB:** Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. *Cancer Res* 50:1873-1878 (1990).
 55. **Green DR:** Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-698 (1998).
 56. **Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I,**

- Westin J:** International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23:3412-3420 (2005).
57. **Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, Bos NA:** Heterogeneity in the multiple myeloma tumor clone. *Leuk Lymphoma* 45:857-871 (2004).
58. **Haller J, Mikics E, Makara GB:** The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol* 29:273-291 (2008).
59. **Hamner JB, Dickson PV, Sims TL, Zhou J, Spence Y, Ng CY, Davidoff AM:** Bortezomib inhibits angiogenesis and reduces tumor burden in a murine model of neuroblastoma. *Surgery* 142:185-191 (2007).
60. **Han AR, Kim K, Jang JH, Kim WS, Ahn JS, Jung CW, Lee MH, Kang WK:** Outcomes of a modified CALGB 19802 regimen in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Korean Med Sci* 23:278-283 (2008).
61. **Harousseau JL, Dreyling M:** Multiple myeloma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 19 Suppl 2:ii55-57 (2008).
62. **Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM:** Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol* 500:51-62 (2004).
63. **Hazarika M, Rock E, Williams G, Dagher R, Sridhara R, Booth B, Farrell A, Justice R, Pazdur R:** Lenalidomide in combination with dexamethasone for the treatment of multiple myeloma after one prior therapy. *Oncologist* 13:1120-1127 (2008).
64. **Herzog H, Oliveto EP:** A history of significant steroid discoveries and developments originating at the Schering Corporation (USA) since 1948. *Steroids* 57:617-623 (1992).
65. **Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC:** Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene* 22:8386-8393 (2003).
66. **Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC:** NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277:16639-16647 (2002).
67. **Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC:** The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61:3071-3076 (2001).

68. **Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E, Magnusson B, Rodjer S, Westin J:** Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I--a randomized study. Myeloma Group of Western Sweden. *Eur J Haematol* 50:95-102 (1993).
69. **Horning SJ:** Risk, cure and complications in advanced hodgkin disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:197-203 (2007).
70. **Huang Z, Roy P, Waxman DJ:** Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem Pharmacol* 59:961-972 (2000).
71. **Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M:** Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 69:323-328 (1982).
72. **IKE:** Plasmozytom und bösartige Plasmazell-Neubildungen (ICD-10 C90), Erkrankungsjahr 2005. Registrierstelle des Krebsregisters Schleswig-Holstein. Insitut für Krebsepidemiologie (IKE) e.V. an der Universität zu Lübeck. <http://www.krebsregister-sh.de/datenbank/index.html>. Stand: 29.10.08. (2005).
73. **Jackmann AK, S. Workman, P.:** The combination oy cytotoxic and molecularly targeted therapies - can it be done? *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 1:445-454 (2004).
74. **Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky R, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Adams J, Kauffman M, Esseltine DL, Schenkein DP, Anderson KC:** A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol* 127:165-172 (2004).
75. **Jagannath S, Richardson PG, Barlogie B, Berenson JR, Singhal S, Irwin D, Srkalovic G, Schenkein DP, Esseltine DL, Anderson KC:** Bortezomib in combination with dexamethasone for the treatment of patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma with less than optimal response to bortezomib alone. *Haematologica* 91:929-934 (2006).
76. **Juge-Morineau N, Francois S, Puthier D, Godard A, Bataille R, Amiot M:** The gp 130 family cytokines IL-6, LIF and OSM but not IL-11 can reverse the anti-proliferative effect of dexamethasone on human myeloma cells. *Br J Haematol* 90:707-710 (1995).
77. **Juge-Morineau N, Harousseau JL, Bataille R:** [Role of glucocorticoids in the treatment of multiple myeloma]. *Ann Med Interne (Paris)* 147:576-579 (1996).
78. **Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R:** United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 12:2955-2960 (2006).

79. **Karin M, Ben-Neriah Y:** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663 (2000).
80. **Katagiri S, Yonezawa T, Kuyama J, Kanayama Y, Nishida K, Abe T, Tamaki T, Ohnishi M, Tarui S:** Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. *Int J Cancer* 36:241-246 (1985).
81. **Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, et al.:** Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83-85 (1988).
82. **Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Yang DH, Lee JJ, Kim HJ, Shin HJ, Jung JS, Kim WS, Kim DH, Suh C, Kim SJ, Eom HS, Bae SH:** Multicenter study of intravenous busulfan, cyclophosphamide, and etoposide (i.v. Bu/Cy/E) as conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 40:919-924 (2007).
83. **King MA, Nelson DS:** Tumor cell heterogeneity in multiple myeloma: antigenic, morphologic, and functional studies of cells from blood and bone marrow. *Blood* 73:1925-1935 (1989).
84. **Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Portier M, Lu ZY, Wijdenes J, Brochier J, Bataille R:** Interleukin-6 is the central tumor growth factor in vitro and in vivo in multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw* 1:193-201 (1990).
85. **Klepin HD, Hurd DD:** Autologous transplantation in elderly patients with multiple myeloma: are we asking the right questions? *Bone Marrow Transplant* 38:585-592 (2006).
86. **Kohl F:** Cortison, die Wunderdroge gegen Rheuma. *Pharmazeutische Zeitung* 10:(2001).
87. **Kohn KW:** Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment--fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 56:5533-5546 (1996).
88. **Krett NL, Pillay S, Moalli PA, Greipp PR, Rosen ST:** A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 55:2727-2729 (1995).
89. **Kropff M, Bisping G, Schuck E, Liebisch P, Lang N, Hentrich M, Dechow T, Kroger N, Salwender H, Metzner B, Sezer O, Engelhardt M, Wolf HH, Einsele H, Volpert S, Heinecke A, Berdel WE, Kienast J:** Bortezomib in combination with intermediate-dose dexamethasone and continuous low-dose oral cyclophosphamide for relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 138:330-337 (2007).

90. **Kropff MH, Bisping G, Wenning D, Volpert S, Tchinda J, Berdel WE, Kienast J:** Bortezomib in combination with dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Leuk Res* 29:587-590 (2005).
91. **Kumar S:** Progress in the treatment of multiple myeloma. *Lancet* 367:791-792 (2006).
92. **Kumar S, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Geyer SM, Iturria NL, Fonseca R, Hayman SR, Lust JA, Kyle RA, Greipp PR, Witzig TE, Rajkumar SV:** Response rate, durability of response, and survival after thalidomide therapy for relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 78:34-39 (2003).
93. **Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA:** Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111:2516-2520 (2008).
94. **Kyle RA:** Clinical aspects of multiple myeloma and related disorders including amyloidosis. *Pathol Biol (Paris)* 47:148-157 (1999).
95. **Kyle RA:** The role of high-dose chemotherapy in the treatment of multiple myeloma: a controversy. *Ann Oncol* 11 Suppl 1:55-58 (2000).
96. **Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR:** Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 78:21-33 (2003).
97. **Kyle RA, Rajkumar SV:** Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *Br J Haematol* 139:730-743 (2007).
98. **Kyle RA, Rajkumar SV:** Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351:1860-1873 (2004).
99. **Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ, 3rd:** Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer* 101:2667-2674 (2004).
100. **Lane DP:** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16 (1992).
101. **LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neubergh D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC:** Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62:4996-5000 (2002).
102. **Levy Y, Labaume S, Colombel M, Brouet JC:** Retinoic acid modulates the in vivo and in vitro growth of IL-6 autocrine human myeloma cell lines via induction of apoptosis. *Clin Exp Immunol* 104:167-172 (1996).

103. **Lüllmann H, Mohr K, Wehling M:** Glucocortikoide. In: Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. 15. Auflage, S. 370-376, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003).
104. **Mani A, Gelmann EP:** The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 23:4776-4789 (2005).
105. **Michallet AS, Coiffier B:** Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood Rev* (2008).
106. **Mignatti P, Rifkin DB:** Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73:161-195 (1993).
107. **Mihou D, Katodritou I, Zervas K:** Evaluation of five staging systems in 470 patients with multiple myeloma. *Haematologica* 91:1149-1150 (2006).
108. **Millenium-Pharmaceuticals:** Millenium Pharmaceuticals, Inc. Velcade® (Bortezomib) for Injection. Prescribing Information. Rev 5. http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2006/May_PIs/Velcade_PI.pdf. Stand: 01.09.08. (2006).
109. **Mitchell CD, Richards SM, Kinsey SE, Lilleyman J, Vora A, Eden TO:** Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *Br J Haematol* 129:734-745 (2005).
110. **Mitsiades CS, McMillin DW, Klippel S, Hideshima T, Chauhan D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC:** The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* 21:1007-1034, vii-viii (2007).
111. **Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC:** Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell* 6:439-444 (2004).
112. **Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC:** The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer* 42:1564-1573 (2006).
113. **Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC:** The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 101:2377-2380 (2003).
114. **Moalli PA, Pillay S, Krett NL, Rosen ST:** Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 53:3877-3879 (1993).

115. **Montagut C, Rovira A, Albanell J:** The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol* 8:313-317 (2006).
116. **Montagut C, Rovira A, Mellado B, Gascon P, Ross JS, Albanell J:** Preclinical and clinical development of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)* 41:299-315 (2005).
117. **Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M:** Glucocorticoide. In: Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, S. 423-428, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2001).
118. **Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D:** The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31:137-155 (2006).
119. **Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC:** IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159:2212-2221 (1997).
120. **Oken MM, Harrington DP, Abramson N, Kyle RA, Knospe W, Glick JH:** Comparison of melphalan and prednisone with vincristine, carmustine, melphalan, cyclophosphamide, and prednisone in the treatment of multiple myeloma: results of Eastern Cooperative Oncology Group Study E2479. *Cancer* 79:1561-1567 (1997).
121. **Orlowski RZ, Small GW, Shi YY:** Evidence that inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling is a factor in proteasome inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 277:27864-27871 (2002a).
122. **Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA, Soignet SL:** Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 20:4420-4427 (2002b).
123. **Osgood EE:** The survival time of patients with plasmocytic myeloma. *Cancer Chemother Rep* 9:1-10 (1960).
124. **Ozaki S, Tanaka O, Fujii S, Shigekiyo Y, Miki H, Choraku M, Kagawa K, Asano J, Takeuchi K, Kitazoe K, Hashimoto T, Abe M, Matsumoto T:** Therapy with bortezomib plus dexamethasone induces osteoblast activation in responsive patients with multiple myeloma. *Int J Hematol* 86:180-185 (2007).
125. **Paule B, Clerc D, Brion N:** [Glucocorticoids and multiple myeloma. Mechanism of action, resistance and clinical use]. *Ann Med Interne (Paris)* 149:502-507 (1998).
126. **Peest D, Ganser A:** [Therapy of multiple myeloma: indications and options]. *Internist (Berl)* 48:1343-1348 (2007).

127. **Ploner C, Schmidt S, Presul E, Renner K, Schrocksnadel K, Rainer J, Riml S, Kofler R:** Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:153-160 (2005).
128. **Podar K, Anderson KC:** The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 105:1383-1395 (2005).
129. **Rajkumar SV, Kyle RA:** Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 80:1371-1382 (2005).
130. **Raju TN:** The Nobel chronicles. 1950: Edward Calvin Kendall (1886-1972); Philip Showalter Hench (1896-1965); and Tadeus Reichstein (1897-1996). *Lancet* 353:1370 (1999).
131. **Ribatti D, Nico B, Vacca A:** Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene* 25:4257-4266 (2006).
132. **Richardson ME, Siemann DW:** DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Res* 55:1691-1695 (1995).
133. **Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orłowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC:** A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 348:2609-2617 (2003).
134. **Richardson PG, Mitsiades C, Ghobrial I, Anderson K:** Beyond single-agent bortezomib: combination regimens in relapsed multiple myeloma. *Curr Opin Oncol* 18:598-608 (2006).
135. **Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, Irwin D, Stadtmauer E, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, Miguel JS, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Alsina M, Rajkumar SV, Lacy M, Jakubowiak A, Dalton W, Boral A, Esseltine DL, Schenkein D, Anderson KC:** Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 110:3557-3560 (2007).
136. **Riedel DA, Pottern LM:** The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 6:225-247 (1992).
137. **Risau W:** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674 (1997).
138. **Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, Anderson KC:** Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res* 66:184-191 (2006).

139. **Roche:** Cell Proliferation Reagent WST-1. Colorimetric assay (WST-1 based) for the nonradioactive quantification of the cell, cell viability, and cytotoxicity. <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644807a.pdf>. Stand: 14.10.08. (2007).
140. **Rohdewald P, Mollmann H, Barth J, Rehder J, Derendorf H:** Pharmacokinetics of dexamethasone and its phosphate ester. *Biopharm Drug Dispos* 8:205-212 (1987).
141. **Samson D, Gaminara E, Newland A, Van de Pette J, Kearney J, McCarthy D, Joyner M, Aston L, Mitchell T, Hamon M, et al.:** Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. *Lancet* 2:882-885 (1989).
142. **Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R:** Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S45-55 (2004).
143. **Schuler U, Ehninger G, Wagner T:** Repeated high-dose cyclophosphamide administration in bone marrow transplantation: exposure to activated metabolites. *Cancer Chemother Pharmacol* 20:248-252 (1987).
144. **Schuler U, Waidelich P, Kolb H, Wagner T, Ehninger G:** Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide administered after total body irradiation of bone marrow transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 40:521-523 (1991).
145. **Selby PJ, McElwain TJ, Nandi AC, Perren TJ, Powles RL, Tillyer CR, Osborne RJ, Slevin ML, Malpas JS:** Multiple myeloma treated with high dose intravenous melphalan. *Br J Haematol* 66:55-62 (1987).
146. **Servida F, Soligo D, Delia D, Henderson C, Brancolini C, Lombardi L, Deliliers GL:** Sensitivity of human multiple myelomas and myeloid leukemias to the proteasome inhibitor I. *Leukemia* 19:2324-2331 (2005).
147. **Sezer O, Niemoller K, Eucker J, Jakob C, Kaufmann O, Zavrski I, Dietel M, Possinger K:** Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 79:574-577 (2000).
148. **Shaheen SP, Talwalkar SS, Medeiros LJ:** Multiple myeloma and immunosecretory disorders: an update. *Adv Anat Pathol* 15:196-210 (2008).
149. **Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B:** Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341:1565-1571 (1999).
150. **Sonneveld P, Schoester M, de Leeuw K:** Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma: effect of cyclosporine on resistant tumor cells. *J Clin Oncol* 12:1584-1591 (1994).

151. **Srikanth M, Davies FE, Morgan GJ:** An update on drug combinations for treatment of myeloma. *Expert Opin Investig Drugs* 17:1-12 (2008).
152. **Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J:** The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 5:2638-2645 (1999).
153. **Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F:** Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 87:503-508 (1994).
154. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C:** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51 (1995).
155. **Wagner A, Hempel G, Boos J:** Trofosfamide: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the oral treatment of cancer. *Anticancer Drugs* 8:419-431 (1997).
156. **Wojcik C, DeMartino GN:** Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 35:579-589 (2003).
157. **Wolowacz SE, Cameron DA, Tate HC, Bagust A:** Docetaxel in combination with doxorubicin and cyclophosphamide as adjuvant treatment for early node-positive breast cancer: a cost-effectiveness and cost-utility analysis. *J Clin Oncol* 26:925-933 (2008).
158. **Younes A:** New treatment strategies for aggressive lymphoma. *Semin Oncol* 31:10-13 (2004).
159. **Zandi E, Karin M:** Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol* 19:4547-4551 (1999).

8 Abkürzungsverzeichnis

AMG	Arzneimittelgesetz
APEX	Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions
CI	Combination Index
CREST	Clinical Response and Efficacy Study of Bortezomib in the Treatment of Relapsing Multiple Myeloma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplant
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
FDA	United States Food and Drug Administration
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HGF	Hepatocyte growth factor
IC50	Mittlere inhibierende Konzentration
IGF	Insulin like Growth Factor
IL	Interleukin
IMiD	Immunomodulatory Drug
ISS	Internationale Staging System
I κ B	Inhibitor of kappa B
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydrogen
NCI	National Cancer Institute
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumjodid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDF-1	Stromal cell derived factor-1

Abkürzungsverzeichnis

SUMMIT	Study of Uncontrolled Multiple Myeloma Managed with Proteasome Inhibition Therapy
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
U/Min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WST-1	Water Soluble Tetrazolium-1

9 Danksagung

Bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Thomas Wagner** möchte ich mich sehr herzlich für das interessante Thema dieser Dissertation und die Möglichkeit zur Arbeit in den Laboren der Abteilung bedanken. Die engagierte Betreuung und professionelle Anleitung zur wissenschaftlichen Tätigkeit haben mir sowohl während des experimentellen Teils, als auch während der schriftlichen Ausarbeitung sehr geholfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Dr. Stephanie Stöltzing** bedanken. Sie stand mir mit außergewöhnlichem Engagement sowie ihrer herzlichen, persönlichen Art zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite. Durch das Lesen und Korrigieren dieser Arbeit mit ideenreichen Vorschlägen hat sie ganz wesentlich zur erfolgreichen Beendigung dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin bedanke ich mich bei **Dr. Martin Butzal** für die Einführung in die Thematik der Arbeit und Unterstützung zu Beginn der experimentellen Phase.

Ferner gilt mein Dank **Monica Vollmert** für die Einweisung in die Arbeitsmethoden der Zellkultur und die erfahrene Betreuung meiner experimentellen Tätigkeiten.

Auch bedanken möchte ich mich bei **Claudia Kauderer** und **Heike Albrecht**, die mir im Labor bei all meinen Fragen tatkräftige Unterstützung boten.

Bei **Dr. Jan Marxsen** bedanke ich mich sehr für die freundliche Hilfe in statistischen Fragen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Vater **Dr. Dr. Reiner Beck** und meiner Freundin **Bianca Lange**, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und meine Arbeit Korrektur gelesen haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christoph Beck
Geburtstag / -ort: 23. August 1979 in Mainz
Familienstand: Ledig
Anschrift: Holstentwiete 13, 22763 Hamburg



Schule und Zivildienst

07/86 - 07/90 Montessori-Grundschule, Köln
08/90 - 07/99 Heinrich-Heine-Gymnasium, Köln
09/96 – 07/97 Schüleraustausch, Patrick Henry High School San Diego, USA
05/99 Allgemeine Hochschulreife, Note: gut (2,0)
08/99 - 06/00 Zivildienst, Johanniter-Unfall-Hilfe in Köln

Studium

09/01 – 07/03 Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität, Buda-
pest, Ungarn
07/03 Ärztliche Vorprüfung, Note: sehr gut (1,5)
09/03 – 05/08 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/04 – 08/05 ERASMUS – Aufenthalt in Spanien, Universitat de Barcelona
01/06 Beginn der Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik I des UK-SH,
Campus Lübeck, unter Leitung von Prof. Dr. med. Thomas Wagner
02/07 – 01/08 Praktisches Jahr am UK-SH, Campus Lübeck
05/08 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut (1,5)